

Université de Sherbrooke

**Autoanticorps anti-ARN hY5 dans les sérums anti-Ro :
Détection, prévalence, spécificité et détermination des épitopes**

par
Mme Dominic Granger
Département de Biochimie
Service de rhumatologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M. Sc.) en Biochimie

15 août 1995



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-09472-3

Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
RÉSUMÉ.....	VIII

1. INTRODUCTION

1.1 APERCU DE LA RECHERCHE.....	1
1.2 DÉROULEMENT D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE NORMALE	3
1.3 INTERACTIONS CELLULAIRES ET PRODUCTION DES ANTICORPS	5
1.3.1 Les immunoglobulines	5
1.3.2 Idiotypie	7
1.4 L'ANTIGÈNE	7
1.4.1 Présentation de l'antigène	8
1.4.2 Nature des déterminants antigéniques	8
1.5 AUTOIMMUNITÉ	9
1.5.1 L'immunogénicité	9
1.5.2 Spécificité des autoanticorps	10
1.5.3 Pathogénicité des autoanticorps.....	11
1.5.4 Mécanismes de production des autoanticorps	14
1.6 CARACTÉRISATION DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro.....	17
1.6.1 La protéine La	20
1.6.2 La protéine Ro60	21
1.6.3 La protéine Ro52.....	22
1.6.4 Rôle de la ribonucléoprotéine Ro	23
1.7 ANTIGÉNICITÉ DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro	25
1.8 AUTOANTICORPS ANTI-ARN.....	25
1.9 PERTINENCE DE LA RECHERCHE.....	30
1.10 OBJECTIFS DE RECHERCHE	32

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CARACTÉRISATION DES SÉRUMS	34
2.2 PRODUCTION DES MUTANTS PAR MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE PAR PCR	34
2.2.1 Plasmide pY5-84	34
2.2.2 Production de l'ADNc pour le mutant Y5-78	36
2.2.3 Production de l'ADNc du mutant Y5-84«O»	37
2.2.4 Clonage de l'ADNc correspondant aux mutants	38
2.2.5 Séquencage de l'ADN	39
2.2.6 Mutant pY5-80	40
2.3 SOUS-CLONAGE DE L'ADNc DE hY1 ET hY4	40
2.4 SYNTHÈSE IN VITRO ET PURIFICATION DES ARN	42
2.5 GEL DE RÉTENTION.....	44
2.6 IMMUNOPRÉCIPITATION DE L'ARN	45
2.7 ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'URÉE- POLYACRYLAMIDE	46
2.8 PRÉDICTION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN.....	46
2.9 RECONNAISSANCE DE L'ADN	46
2.10 PURIFICATION DES AUTOANTICORPS ANTI-ARN hY5	
2.10.1 Production de l'ARN-biotinylé.....	48
2.10.2 Essai de «dot-blot»	48
2.10.3 Reconnaissance de l'ARN biotinylé	49
2.10.4 Vérification du lien biotine-streptavidine	50
2.10.5 Purification des autoanticorps anti-ARN hY5	50

3. RÉSULTATS

3.1 RECONNAISSANCE SPÉCIFIQUE DE L'ARN hY5 PAR DES AUTOANTICORPS; PREMIÈRE ÉVIDENCE.....	52
3.2 DÉTECTION ET PRÉVALENCE DES SÉRUMS PRODUISANT DES ANTI-ARN hY5.....	53

3.3	SPÉCIFICITÉ DES SÉRUMS ANTI-ARN hY5 IDENTIFIÉE PAR GEL DE RÉTENTION.....	54
3.4	CLONAGE DES ADNc CORRESPONDANTS AUX ARN hY1 ET hY4.....	58
3.5	COMPARAISON DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN Ro.....	62
3.6	LES ÉPITOPES SONT CONFORMATIONNELS.....	63
3.7	PRODUCTION D'ARN hY5 MUTANTS.....	63
3.8	DÉTERMINATION DES ÉPITOPES DE L'ARN hY5	70
3.9	LOCALISATION DES ÉPITOPES SUR L'ARN hY5.....	76
3.10	NON-RECONNAISSANCE D'UN OLIGONUCLÉOTIDE ADN, CORRESPONDANT À L'EXTRÉMITÉ 3' DE L'ARN hY5	79
3.11	PURIFICATION DES ANTI-ARN hY5.....	81
3.11.1	Production de l'ARN hY5-biotinylé.....	83
3.11.2	Reconnaissance de l'ARN hY5-biotinylé	83
3.11.3	Interaction biotine-streptavidine	84
3.11.4	Essai d'affinité en suspension	87
4.	DISCUSSION	89
	REMERCIEMENTS.....	102
	RÉFÉRENCES	103
	ANNEXES.....	117

LISTE DES FIGURES

FIGURES	PAGE
1. Structure secondaire des ARN Ro	19
2. Identification des fragments reconnus par le sérum JW	27
3A. Schéma de pY5-84 et des ARN produits à l'aide de ce plasmide	35
3B. Le plasmide pY5-80	35
3C. Le plasmide pY5-78	35
3D. Le plasmide pY5-84«O»	35
4. Détection des sérums hY5 positifs, en gel de rétention	55
5. Spécificité des anticorps anti-hY5	57
6. Séquençage de l'ADN du plasmide pY1-112	60
7. Séquençage de l'ADN du plasmide pY4-95	61
8. Schéma des différentes mutations effectuées sur l'ARN hY5	65
9. Séquençage complet de l'ADN du plasmide pY5-78	66
10. Séquençage du plasmide pY5-78; région mutée	67
11. Séquençage du plasmide pY5-84«O»; région mutée	68
12. Structure secondaire prédite des ARN mutants	71
13. Première évidence de l'existence de deux populations différentes d'anti-ARN hY5	72
14. Immunoprécipitation comparée de l'ARN hY5-84 sur billes de protéines A, versus sur billes de protéine G, par les sérums JW et MCD	73
15. Mise en évidence des 2 épitopes de l'ARN hY5	75

16.	Corrélation entre le gel de rétention et l'immunoprécipitation pour le sérum JW	77
17.	Corrélation entre le gel de rétention et l'immunoprécipitation pour le sérum MCD	78
18.	Schéma des épitopes de l'ARN hY5 reconnus par les autoanticorps	80
19.	Non-reconnaissance d'un oligonucléotide d'ADN correspondant à l'extrémité 3' de l'ARN hY5	82
20.	Contrôles pour la mise au point de l'essai d'affinité en suspension	85
21.	Vérification de la reconnaissance de l'ARN hY5-84 par les IgG anti-hY5-spécifiques purifiées	89

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAUX		PAGE
1.	Identification des sérums contenant des autoanticorps anti-ARN hY5, en gel de rétention	56
2.	Résultats de la mise au point de l'essai d'affinité en suspension	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BSA	Albumine bovine
Da	Dalton
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
IgG	Immunoglobuline de classe G
IPP	Immunoprécipitation
kDa	KiloDalton
LED	Lupus érythémateux disséminé
nt	Nucléotides
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
RNP	Ribonucléoprotéine
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
NHS	Sérum humain normal
NLE	Lupus érythémateux néonatal
RNP-80	Motif de reconnaissance de l'ARN
SS	Syndrome de Sjögren
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
Tris	Hydroxyméthyl-aminométhane
U	Unité
UV	Ultraviolet

RÉSUMÉ

AUTOANTICORPS ANTI-ARN hY5 DANS LES SÉRUMS ANTI-Ro : DéTECTION, PRÉVALENCE, SPÉCIFICITÉ ET DÉTERMINATION DES ÉPITOPES

par Mme Dominic Granger
Département de Biochimie,
Service de Rhumatologie,
Université de Sherbrooke,
Sherbrooke.

**Mémoire présenté le 15 août 1995, à la Faculté de Médecine en vue de
l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en Biochimie.**

Les ribonucléoprotéines (RNP) sont les autoantigènes les plus fréquemment reconnus par les patients avec collagénose. Les RNP Ro sont des composantes cellulaires de faible abondance dont on ne connaît pas encore la fonction biologique. Elles sont formées par l'association d'un ARN Ro : hY1, hY3, hY4 ou hY5 à au moins une des deux protéines : Ro60 et La. Les autoanticorps sont habituellement dirigés contre les portions protéiques des antigènes, mais nous avons observé que certains sérums contiennent des autoanticorps spécifiques à l'ARN hY5 nu (et non les autres ARN hY).

Nous avons développé une méthode rapide et sensible pour détecter les autoanticorps anti-ARN hY5 qui utilise le retard de migration en gel d'acrylamide non-dénaturant, lors de la liaison de l'autoanticorps, de l'ARN hY5 radiomarké, produit *in vitro*. Par cette méthode, 10 sur 44 (23%) sérums anti-Ro (contenant aussi des autoanticorps dirigés contre les protéines Ro) retardent

de façon spécifique l'ARN hY5 nu. Grâce à la production d'ARN mutants, nous avons identifié deux populations d'autoanticorps. Une première population d'autoanticorps (2 sérums) reconnaît la région simple brin 3' terminale de l'ARN hY5, tandis que l'autre population (8 sérums) reconnaît une région double brin distincte du site de liaison de la protéine Ro60. Nous avons démontré que 1) les autoanticorps qui reconnaissent spécifiquement l'ARN hY5 ne sont pas tous dirigés contre le même épitope 2) les épitopes ciblés par ces deux groupes d'autoanticorps se situent dans deux régions distinctes du site de liaison de la protéine Ro60 et donc accessibles pour interagir avec d'autres protéines. Nos résultats suggèrent que les RNP Ro^{hY5} pourraient participer au processus d'immunisation conduisant à la production des autoanticorps anti-Ro.

1. INTRODUCTION

L'immunologie est la discipline biologique et médicale qui étudie la physiologie et la pathologie des moyens de défense d'un organisme, c'est-à-dire des facteurs humoraux et/ou cellulaires qui participent à la protection de cet organisme. Le fonctionnement normal de ces moyens de protection constitue l'immunité. L'immunité a le plus souvent des effets bénéfiques en assurant la survie de l'organisme en maintenant son intégrité. Une protection efficace s'accompagne d'un rejet, d'une élimination des agresseurs (microorganismes, tumeurs). Les moyens de défense peuvent être l'objet de dérèglements, et dans le cas où des anticorps sont produits contre certaines composantes ou produits de nos propres tissus, on parle alors d'autoimmunité.

1.1 APERÇU DE LA RECHERCHE

Notre équipe de recherche s'intéresse tout particulièrement à un groupe restreint d'autoanticorps qui reconnaît la RNP (ribonucléoprotéine) Ro. Cette composante cellulaire mineure est fréquemment reconnue par des anticorps présents dans le sérum de personnes souffrant de collagénose (Slobbe et al., 1991; Harley et al., 1992; Chan et Andrade, 1992; Tan, 1989). Les anticorps anti-Ro sont détectés principalement chez les personnes atteintes du syndrome

de Sjögren¹ (SS) et du lupus érythémateux disséminé² (LED) à des fréquences respectives de 40 à 95% (selon la technique utilisée) et de 40% (Harley et al., 1992). L'étude de l'antigénicité de la RNP Ro vise essentiellement à développer de meilleurs outils diagnostiques et à connaître les mécanismes par lesquels ces autoanticorps sont produits. L'information concernant l'immunogénicité de la RNP Ro pourrait fournir de nouveaux éléments permettant la compréhension des phénomènes qui induisent l'autoimmunité (Whittingham, 1992). D'autre part, les anticorps anti-Ro, qui ont d'ailleurs permis l'identification des RNP Ro, servent actuellement à caractériser cette particule dont la fonction biologique n'est pas encore connue. Plus particulièrement, ils permettent l'étude des interactions qui se produisent au sein de la RNP Ro (Slobbe et al., 1992; Pruijn et al., 1991).

Les autoanticorps anti-Ro sont connus pour leur capacité à immunoprécipiter les RNP Ro via leurs reconnaissance de la protéine Ro60. Cependant, depuis quelques années, nous avons identifié 2 sérums contenant à la fois des anticorps dirigés contre les protéines Ro60 et des anticorps dirigés contre un des ARN constituant de ces RNP, soit l'ARN hY5 (Boire et al., 1989; Boulanger et al., 1995). Aucun des autres ARN hY n'est reconnu par ces

¹ "Le syndrome de Sjögren associe une kératoconjonctivite sèche, une xérostomie (sécheresse de la bouche), avec ou sans hypertrophie parotidienne, et une polyarthrite. Le SS peut être isolé mais dans d'autres cas, il est associé à une arthrite évoquant en tous points une polyarthrite rhumatoïde ou à d'autres symptômes évoquant d'un lupus érythémateux disséminé ou d'une sclérodermie" (Bach, 1984).

² Le lupus érythémateux disséminé est une maladie caractérisée par des manifestations cliniques plurifocales, touchant notamment la peau, les articulations et

anticorps. Ces résultats suggèrent que la RNP Ro hY5 est particulièrement immunogénique. La présente étude vise donc à mieux caractériser ces autoanticorps anti-ARN hY5 dans le but de définir plus précisément le ou les épitopes qu'ils reconnaissent sur l'ARN hY5.

1.2 DÉROULEMENT D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE NORMALE

Le système immunitaire possède plusieurs mécanismes pour fournir à l'organisme une protection contre l'infection. Parmi ceux-ci, mentionnons l'immunité naturelle; la phagocytose, le système du complément, des facteurs anti-microbiens. Habituellement, mais non obligatoirement, la réponse immunitaire est dirigée contre des substances, des tissus étrangers à l'organisme qui est le siège de cette réponse immunitaire. Ces produits étrangers à l'organisme sont les antigènes ou immunogènes et correspondent à ce qui est appelé le «non soi» (virus, bactéries, champignons). À l'opposé, le «soi» est représenté par le système immunitaire composé d'organes et de cellules de l'immunité et par tous les tissus de l'organisme lui-même.

Les moyens de défense utilisés par l'organisme sont non spécifiques tels la barrière cutanée, les muqueuses et les phagocytes, ou spécifiques tels les lymphocytes. Il existe deux types principaux de lymphocytes, ceux qui

les reins, associées à la production d'anticorps réagissant avec des déterminants cellulaires nucléaires, cytoplasmiques et membranaires.

dépendent du thymus ou lymphocytes T, ceux qui n'en dépendent pas ou lymphocytes B. Les lymphocytes T et B sont les cellules immunologiquement compétentes dont une fonction essentielle est la reconnaissance et l'identification de l'antigène. C'est grâce aux lymphocytes T que le système immunitaire peut différencier le «soi» du «non-soi». Cette reconnaissance de l'antigène se fait au moyen de récepteurs portés par les lymphocytes T et B. Le résultat de l'interaction du récepteur du lymphocyte T avec l'antigène est à l'origine d'une chaîne d'événements successifs qui aboutit à l'activation du lymphocyte T et à la libération de diverses molécules (interleukines) inhibitrices ou coopérantes, impliquant l'action d'autres cellules. Tous ces événements formant la réponse immunitaire sont orientés vers la destruction de l'antigène «non-soi».

La réponse immunitaire implique deux aspects. Le premier implique la réponse à médiation cellulaire, faisant intervenir des phénomènes de cytotoxicité cellulaire (lymphocytes cytotoxiques, macrophages, etc.) sur le plan de mécanismes effecteurs. Le deuxième se rapporte à la réponse à médiation humorale caractérisée par l'action des lymphocytes B capables de sécréter des glycoprotéines qui ont une activité anticorps, c'est-à-dire capables de se lier spécifiquement à l'antigène, et d'en faciliter l'élimination. Les deux types de réponses, humorales et cellulaires, sont étroitement liées, dans la mesure où les différentes étapes d'activation et de différenciation des lymphocytes B en

cellules productrices d'anticorps sont sous la dépendance de signaux émis par les lymphocytes T : soit par contact cellulaire, soit par le biais de médiateurs solubles.

1.3 INTERACTIONS CELLULAIRES ET PRODUCTION DES ANTICORPS

La production d'immunoglobulines dirigées contre un antigène donné nécessite plusieurs étapes. Tout d'abord, la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes B possédant les récepteurs de surface appropriés. Cette étape, spécifique de l'antigène, est suivie d'une cascade d'interactions cellulaires responsables de l'activation des lymphocytes B spécifiques, leur conférant la sensibilité à des signaux ultérieurs, indépendants de l'antigène, qui vont permettre, les deux étapes suivantes. La première étant la prolifération des cellules activées, donc l'expansion d'un clone de cellules spécifiques de l'antigène. La deuxième consiste en la différenciation des cellules activées en cellules sécrétant des anticorps de même spécificité.

1.3.1 Les immunoglobulines

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines synthétisées par les lymphocytes B et par leur descendance. À la surface de ces lymphocytes B, elles servent de récepteur à l'antigène, et, excrétées après transformation des lymphocytes B, elles sont capables de se coupler spécifiquement à l'antigène ou

à d'autres anticorps. La spécificité de l'anticorps est due aux régions variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL), tandis que les diverses activités biologiques (ex. fixation du complément, liaison aux récepteurs Fc) sont assumées par les régions constantes des chaînes lourdes (CH). Dans un sérum normal, il existe plus de 10^8 molécules différentes d'immunoglobulines (pour une concentration moyenne de 20 g/l) formant une vaste famille dont les membres possèdent des propriétés biologiques propres en plus de la fonction anticorps. On les regroupe en 5 classes principales; IgG, IgA, IgM, IgD et IgE, par ordre de concentration décroissante dans le sérum humain normal. Certaines de ces classes comportent à leur tour des sous-classes assimilables à des isotypes. Les isotypes sont des caractères des immunoglobulines qui sont particuliers à l'espèce. Chez l'homme, on identifie 4 sous-classes d'IgG, 2 d'IgM et 2 d'IgA.

Ainsi, les immunoglobulines sont à la fois les sentinelles qui détectent la présence de l'antigène et mettent en oeuvre la réponse immunitaire ainsi que les acteurs de la réaction qui débarrassent l'organisme des agents pathogènes. Elles jouent aussi un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire, car elles sont à la fois les initiatrices et les produits.

1.3.2 Idiotypie

Cette notion recouvre en fait l'extrême diversité des immunoglobulines. Elle est due au caractère unique et original de la partie hypervariable exprimée par la molécule provenant d'un clone donné. L'idiotype est le motif antigénique propre à l'immunoglobuline produite par ce clone cellulaire, formé par la région VH, VL ou par la structure VH-VL. Les idiotypes peuvent être privés (présents chez un individu unique) ou publics (présents chez plusieurs individus, habituellement chez une même lignée ou espèce).

1.4 L'ANTIGÈNE

Comme nous l'avons déjà mentionné, les antigènes sont des substances capables de stimuler la production d'anticorps ou plus généralement une réponse immunitaire. Toutes substances naturelles ou synthétiques reconnues par le système immunitaire est donc un antigène. Les antigènes se regroupent en 5 grandes familles distribuées tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. Ces familles sont celles des haptènes (de faible poids moléculaire), des antigènes protéiques, des polysaccharides, des lipides (lorsqu'ils sont couplés à des protéines), et des acides nucléiques contre lesquels des quantités importantes d'anticorps sont produits dans certaines maladies autoimmunes.

1.4.1 Présentation de l'antigène

La présentation de l'antigène par certaines cellules (macrophages et cellules dendritiques, par exemple) est nécessaire à l'induction de la réponse immunitaire. Ces cellules présentatrices de l'antigène ont pour particularité de porter sur leur membrane des molécules (dites d'histocompatibilité de classe II), propres à chaque individu et capables, à la fois, de fixer les molécules antigéniques et d'être reconnues par les lymphocytes T auxiliaires.

1.4.2 Nature des déterminants antigéniques

Un ou plusieurs anticorps peuvent se fixer à un antigène, par conséquent l'antigène ne représente pas, sur le plan moléculaire, le site qui est reconnu par l'anticorps. En effet, l'antigène a une taille habituellement supérieure à la structure moléculaire sur laquelle se fixe l'anticorps. Cette partie de l'antigène qui est reconnue par l'anticorps, c'est le déterminant antigénique ou épitope. Un antigène peut avoir plus d'un épitope.

Certains épitopes persistent lorsque les structures secondaires et tertiaires des antigènes (protéines, ADN, ARN) sont modifiées. Les épitopes en question sont localisables sur l'antigène, en particulier il est possible de connaître la position et la nature des acides aminés (protéines) ou des nucléotides (ADN, ARN) entrant dans leur constitution, ce sont les épitopes (ou déterminants) séquentiels. Les déterminants conformationnels ne s'expriment au contraire que

lorsque les structures secondaires, tertiaires, quaternaires des molécules ciblées par les anticorps sont intactes.

1.5 AUTOIMMUNITÉ

Il s'agit d'une situation immunopathologique s'accompagnant d'une rupture de la tolérance au «soi» accompagnée de manifestations cliniques. En effet, les mécanismes à médiation cellulaire et humorale sont régulés de telle sorte que les antigènes du «soi», identifiés par le système immunitaire, sont protégés des mécanismes effecteurs de rejet. Si le système immunitaire se dérègle, certains antigènes du «soi» peuvent déclencher une réponse pathologique qui engendre des maladies autoimmunes. Mentionnons cependant, que certains autoanticorps jouent un rôle bénéfique en transportant les produits de dégradation cellulaire et en aidant par le fait même à débarrasser ces molécules de la circulation.

1.5.1 L'immunogénicité

Pour qu'un antigène devienne immunogène, il doit d'abord être accessible aux lymphocytes B, comme par exemple les antigènes de surface cellulaire. Cependant un antigène peut être accessible et ne pas être immunogène. Dans plusieurs maladies autoimmunes, les antigènes sont intracellulaires donc normalement inaccessibles aux autoanticorps circulants. Dans certaines circonstances (e.g. apoptose), les molécules intracellulaires pourraient échapper

à la dégradation autolytique et être relâchées dans le milieu extracellulaire (Mountz et la., 1994; Carson et Ribeiro, 1993). Dans ces cas, ces molécules pourraient être capables de réagir avec les anticorps préexistants en circulation, former des complexes antigène/anticorps et initier l'inflammation. Ceci a été montré entre autres pour l'ADN (Schwartz et Stollar, 1985). Une autre hypothèse suggère que la lyse cellulaire normale libère les autoantigènes intracellulaires qui deviennent ainsi accessibles aux anticorps.

L'antigène Ro quant à lui est une particule de localisation intracellulaire quoiqu'une expression de l'antigène Ro au niveau de la surface cellulaire a déjà été observée (Furukawa et al., 1990; Furukawa et al., 1988; Lee et al., 1985) et pourrait expliquer en partie les évidences indirectes de pathogénicité des anticorps anti-Ro qui ont été rapportées.

1.5.2 Spécificité des autoanticorps

Les maladies autoimmunes peuvent être placées le long d'un spectre allant des maladies spécifiques d'organe aux maladies non spécifiques d'organe. A l'une des extrémités de ce spectre se trouve la thyroïdite de Hashimoto, une maladie associée à des autoanticorps spécifiques d'un organe; la thyroïde (Roitt, 1990). Au centre du spectre se trouvent les troubles pour lesquels les lésions sont encore localisées à un seul organe, mais qui sont associées à des anticorps non spécifiques de cet organe. A l'autre extrémité du spectre se trouvent les

maladies non spécifiques d'un organe, dont l'un des meilleurs exemples est le lupus érythémateux disséminé (LED) dans lequel ni les lésions, ni les autoanticorps ne sont spécifiques d'un organe (Roitt, 1990). Comme la spécificité antigénique est généralement associée à une maladie en particulier ou à un groupe restreint de maladies, l'identification des autoanticorps présents dans un sérum permet donc de confirmer un diagnostic (Tan, 1989; Hardin, 1986).

1.5.3 Pathogénicité des autoanticorps

La coïncidence de la présence d'autoanticorps spécifiques d'organes et de manifestations cliniques concernant l'organe vis-à-vis duquel sont dirigés les autoanticorps est une éventualité fréquente. Il est cependant généralement difficile de dire si les autoanticorps : 1) sont la cause de ces manifestations cliniques, 2) y sont associés (un autre mécanisme faisant par exemple intervenir l'immunité à médiation cellulaire étant responsable de la maladie), 3) ou n'en sont que la conséquence.

Il existe, pour certaines maladies, une corrélation entre le changement dans le niveau des autoanticorps et l'activité de la maladie. Ce phénomène est rencontré par exemple chez les gens produisant des anti-ARN U1. Une corrélation a été rapportée entre les exacerbations de la collagénose mixte (Mixed Connective Tissue disease ou MCTD) et dans l'augmentation de la production d'anticorps anti-ARN U1 (Hoet et al., 1992a). Une telle corrélation

est aussi rapportée chez les patients atteints de LED produisant des anti-ADN double brin (Lloyd et Schur, 1981).

Les autoanticorps contre les antigènes Ro et La sont retrouvés dans le sérum de patients atteints de différents désordres autoimmuns, mais ne semblent pas spécifiques à une maladie. La fréquence des anti-Ro et anti-La dépend du test utilisé pour la sélection. Les anti-Ro sont présents dans approximativement 30% des sérums de patients atteints de SLE par la technique d'immunodiffusion mais dans moins de 20% des patients par analyse Western. Ces résultats sont expliqués par la réactivité des sérums anti-Ro qui serait dirigée contre des épitopes conformationnels et/ou aux complexes ARN-protéines qui sont dissociés pendant la préparation de l'antigène pour immunobuvardage. Inversement, les anti-La sont détectés dans approximativement 20% des sérums par immunodiffusion et 50-60% des sérums par blot. Quand les deux tests sont employés, les anti-Ro et les anti-La sont presque toujours présents en même temps dans le même sérum, il existe cependant des sérums anti-Ro spécifiques mais à peu près aucun sérum anti-La spécifique.

Les autoanticorps anti-Ro/La sont importants cliniquement puisqu'ils sont associés avec le lupus érythémateux cutané subaigu (SCLE), le syndrome de Sjögren, le lupus érythémateux néonatal (NLE) ainsi que dans la polyarthrite rhumatoïde avec certaines manifestations extraarticulaires (Boire et al., 1993).

Les anticorps retrouvés chez les enfants atteints de NLE proviennent du passage des IgG maternels vers l'enfant à travers le placenta. Effectivement ces enfants voient leurs symptômes diminuer (manifestations cutanées) à mesure que les anticorps maternels sont éliminés de la circulation sanguine de l'enfant (Buyon et Winchester, 1990). De façon plus directe, les anticorps anti-Ro/La sont présents chez presque 100% des mères des enfants ayant un bloc atrioventriculaire cardiaque congénital et des dépôts d'anticorps maternels ont été détectés dans les tissus cardiaques de ces enfants (Lee et al., 1985). Cependant la pathogénèse du lupus néonatal n'est pas exclusivement causée par la présence des autoanticorps, car plusieurs mères avec des autoanticorps anti-Ro donnent naissance à une progéniture saine.

On retrouve aussi des anti-Ro chez plus de 60% des personnes atteintes de lupus érythémateux cutané subaigu. L'activité de cette maladie est influencée par les rayons du soleil (rayons ultraviolets; UV). Cette relation entre la présence d'anti-Ro versus l'exposition aux rayons UV a été rapportée de façon expérimentale sur des kératinocytes en culture. En effet, il a été démontré qu'une exposition aux rayons UV (LeFeber et al., 1984) ou un traitement à l'estradiol (Furukawa et al., 1988) des kératinocytes en culture, entraînent l'expression de l'antigène Ro à leur membrane cellulaire. De plus, un modèle animal a été développé afin d'étudier s'il y a corrélation entre la pathogénicité des anticorps anti-Ro et l'exposition aux rayons UV. Le modèle consiste en une

souris immunodéficiente qui a reçu une greffe de peau humaine, et par la suite des anticorps anti-Ro par immunisation passive (Lee et al., 1986). Les résultats démontrent que, suite à une exposition de ces souris aux rayons UV, il se forme des dépôts d'anticorps seulement sur la peau humaine greffée, identiques à ceux retrouvés chez les patients atteints du lupus érythémateux cutané subaigu. De plus, la quantité de dépôts d'anticorps anti-Ro présents chez les souris greffées était proportionnelle à la dose d'irradiation reçue par celles-ci. Ces résultats démontrent que les anticorps anti-Ro se lient à la peau, particulièrement à l'épiderme, et supportent l'hypothèse que les anti-Ro sont impliqués dans le développement du lupus érythémateux cutané subaigu. (Lee et al., 1989).

1.5.4 Mécanismes de production des autoanticorps

La production d'autoanticorps peut résulter d'une réponse immune déclenchée suite à un contact avec un antigène ou d'une régulation lymphocytaire défectueuse (Dziarsk et al., 1988).

Dans le premier cas, le déterminant potentiellement autoantigénique est présent sur une molécule exogène; c'est alors par réaction croisée que peut se produire la formation d'autoanticorps; c'est le mimétisme moléculaire (Roitt, 1990; Baum et al., 1993). C'est le cas du rhumatisme articulaire aigu, où les anticorps produits contre les streptocoques réagissent également contre le coeur. Par contre si l'antigène est d'origine endogène, il peut jouer un rôle direct dans

l'induction et dans le maintien ou la persistance de l'autoimmunité (Plotz et al., 1992).

La dysrégulation lymphocytaire peut également s'expliquer, entre autres, par une apoptose défectueuse. En effet, les maladies autoimmunes sont associées à une diversité de manifestations anormales; augmentation de cytokines proinflammatoires, diminution des cytokines antiinflammatoires, augmentation du nombre de cellules B et de cellules T, production d'autoanticorps, et bien d'autres. Il est suggéré que pour expliquer tous ces changements immunologiques, il doit exister un défaut dans l'habileté à éliminer les cellules T et les cellules B auto-réactives. Dans des conditions normales, les lymphocytes immatures qui lient un autoantigène meurent par apoptose (Mountz et al., 1994). Cependant, un défaut dans l'élimination de ces lymphocytes par apoptose peut prédisposer à l'autoimmunité. En effet, les patients atteints de LED possèdent un niveau augmenté d'une protéine nommée Fas (produit du gène *fas*) qui agit comme médiateur de l'apoptose des lymphocytes (Cheng et al., 1994). Dans les modèles animaux de maladies autoimmunes, des mutations de gènes impliqués dans l'apoptose; incluant *fas* et le récepteur de Fas ont été identifiés. Les oncogènes *bcl-2*, *p53* et *myc*, qui régulent l'apoptose sont aussi exprimés de façon anormale chez ces modèles animaux (Carson et Ribeiro, 1993). De plus, des inducteurs potentiels de l'apoptose incluant les stéroïdes, l'azathioprine, le cyclophosphamide et le méthotrexate sont les thérapies les plus efficaces, à l'heure actuelle, contre les maladies autoimmunes (Mountz et al.,

1994). Cette théorie soutient le fait que tous les individus produiraient des lymphocytes autoréactifs mais un défaut dans le mécanisme d'élimination les rendraient occasionnellement pathogènes.

D'autres hypothèses concernant la production d'autoanticorps sont aussi proposées par différents auteurs. Mentionnons l'activation polyclonale non spécifique des lymphocytes B qui implique une sécrétion d'anticorps sans stimulation par un antigène (Dziarki et al., 1988). Aussi un antigène pourrait modifier directement une particule «soi» ou encore modifier le «soi» en modifiant le complexe majeur d'histocompatibilité, résultant en une stimulation des cellules T auxiliaires et des cellules B (Elkon, 1994).

La production des autoanticorps anti-ARN hY5 semble être causée par une présentation directe des RNP Ro^{hY5}. Cette hypothèse résulte des observations suivantes. Les anticorps anti-ARN hY5 sont retrouvés uniquement dans les sérums produisant des anti-Ro. De plus, la reconnaissance de l'ARN hY5 semble très spécifique et ne pourrait donc résulter d'une activation non-spécifique des lymphocytes B.

1.6 CARACTÉRISATION DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro

C'est en 1969, qu'un nouvel antigène est décrit dans les extraits de tissu humain par immunodiffusion (Clark et al., 1969). Les autoanticorps reconnaissant cette protéine et retrouvés chez les patients atteints de LED et du syndrome de Sjögren (SS), sont nommés : anti-Ro (car obtenus du sérum d'une Mme Robert). La spécificité anti-La a été identifiée par la suite parmi des sérums anti-Ro chez une patiente appelée Lavoie (Mattioli et Reichlin, 1974). En 1975, Alspaugh et Tan démontrent de façon similaire l'existence d'autoanticorps chez les patients atteints du SS, qu'ils désignent SS-A et SS-B (Alspaugh et Tan, 1975). Plus tard, il est démontré que les autoanticorps SS-A sont équivalents aux anti-Ro et que les autoanticorps SS-B sont identiques aux autoanticorps anti-La (Alspaugh et Maddison, 1979).

En 1981, Lerner et al. démontrent que les sérums humains Ro/SS-A immunoprécipitent une nouvelle classe de petits ARN qu'ils désignent les ARN (h) pour humain et Y pour cYtoplasmique ou ARN hY (Lerner et al., 1981; Hendrick et al., 1981). En 1984, Wolin et Steitz montrent que l'immunoprécipitation (IPP) de l'ARN hY résulte de la liaison des autoanticorps Ro/SS-A à une protéine de 60 kD liée aux ARN hY (Wolin et Steitz, 1984). En 1988, Ben-Chetrit et al. démontrent la présence d'un nouvel antigène de 52 kD distinct de Ro60, reconnue par immunobuvardage (Ben-Chetrit et al., 1988) en utilisant des sérums anti-Ro. Les mêmes auteurs suggèrent que cette protéine

de 52 kD est associée aux ARN hY. Par la suite les gènes codant pour les autoantigènes 60 kD et 52 kD ont été isolés. Chez les érythrocytes et les plaquettes, une protéine de 60 kD ou de 54 kD, mais non la protéine La, est trouvée complexée avec une sous-classe des ARN hY (Rader et al., 1989; Itoh et al., 1991). En 1994, O'Brien et Wolin mettent en évidence un rôle potentiel de la protéine Ro60 chez le *Xenopus leavis* (O'Brien et Wolin, 1994). En 1994 l'équipe de Boire ainsi que celle de Keene démontrent que la protéine de 52 kD n'est pas une protéine Ro (Boire et al., 1995; Keene et al., 1994).

La ribonucléoprotéine Ro est de faible abondance, environ de $1-5 \times 10^5$ copies par cellules, ou environ 1/100 le nombre de ribosomes. Elle consiste en une molécule d'ARN et d'au moins 2 protéines connues; Ro60 et La (Hendrick et al., 1981). Dans les cellules humaines nucléées, on retrouve 4 petits ARN, variant de 84 à 112 nucléotides, nommés hY1, hY3, hY4 et hY5 (hY2 étant un produit de dégradation de hY1) (Wolin et Steitz, 1983). Le séquençage de l'ARN hY5 a démontré qu'il s'agissait d'une molécule de 84 nt de longueur, riche en uridine (38%) et sans base modifiée (Kato et al., 1982). Le clonage des gènes des ARN hY1 et hY3 a révélé que leurs gènes sont adjacents et sont présents en une seule copie dans le génome humain (Wolin et Steitz, 1983). Plus tard, les ADNc des ARN hY4 et hY5 ont aussi été clonés (O'Brien et Harley, 1990; Pruijn et al., 1991). Les structures secondaires prédites pour les ARN hY sont montrées à la Figure 1.

Figure 1. Structure des ARN Ro

Pour évaluer la structure secondaire la plus probable adoptée par chaque ARN Ro, les séquences des ARN hY1, hY3 (Wolin et Steitz, 1983), hY4 (O'Brien et Harley, 1990) et hY5 (Kato et al., 1982) ont été traitées par ordinateur à l'aide du programme FOLD (Zuker et Stiegler, 1981). Les séquences encadrées représentent les régions conservées entre les ARN Ro humains. La plus grande de ces trois régions comprend le site de liaison de la protéine Ro 60 kD. L'extrémité 3' correspond au site de liaison de la protéine La.

(): indique que le nucléotide n'est pas toujours présent

1.6.1 La protéine La

L'ADNc codant pour la protéine La entière a été isolé par plusieurs groupes (Chambers et al., 1988; Chan et Tan, 1987a). La protéine est composée de 408 acides aminés avec un poids moléculaire de 47 kDa. Elle contient un domaine d'environ 80 acides aminés que l'on nomme le motif de reconnaissance de l'ARN (RNP-80), essentiel pour sa liaison à l'ARN (Chambers et al., 1988). La protéine La est de localisation nucléaire et s'associe à toutes les molécules d'ARN transcrites par l'ARN polymérase III (Hendrick et al., 1981). Ces ARN comprennent l'ARN 7S, l'ARNr 5S, les ARNt, l'ARN U6, les ARN Ro et aussi quelques petits ARN viraux (Lerner et al., 1981; Pizer et al., 1983). Le site de liaison de la protéine La correspond à l'extrémité 3' poly-uridine commune aux transcrits de l'ARN polymérase III (Stefano, 1984). Puisque la séquence motif 3' est souvent perdue lors de la maturation des transcrits, la protéine La se lie donc au précurseur d'ARN de façon transitoire. Cependant les ARN Ro matures conservent toujours la région de liaison pour la protéine La, celle-ci fait donc partie intégrante des RNP Ro (Boire et Craft, 1990) et forme une sous-classe de RNP Ro (Mamula et al., 1989b). La protéine La est très bien conservée dans l'évolution. Ceci se révèle par la très grande conservation des acides aminés entre l'humain, le boeuf et *Xénopus laevis* et par le fait que les protéines La de différentes espèces sont immunoréactives avec les autoanticorps humains (Chan et Tan, 1987b). Il a été démontré que la protéine La est requise pour une

terminaison efficace de la transcription par l'ARN polymérase III (Gottlieb et Steitz, 1989).

1.6.2 La protéine Ro60

En 1988, Deutscher et al. rapportent le clonage de l'antigène Ro60 à partir d'une librairie d'ADNc de placenta humain (Deutscher et al., 1988). La protéine Ro60 (60 kDa) se lie dans la région appariée des bases de l'extrémité 5' et 3' de tous les ARN Y (Wolin et Steitz, 1984). La protéine Ro60 contient un motif RNP-80 impliqué dans l'interaction ARN-Ro60 ainsi qu'une structure en doigt de zinc similaire à celle observée chez les protéines liant l'ADN. (Deutscher et al., 1988; Ben-Chetrit et al., 1989). De plus, il est clair que la conformation de Ro60 est extrêmement importante pour sa liaison aux ARN hY (Slobbe et al., 1991). Ro60 est conservée à travers les espèces. Son rôle était jusqu'à dernièrement obscur. Récemment, les travaux de O'Brien (O'Brien et Wolin, 1994) proposent un rôle possible pour la protéine Ro dans un processus d'élimination des précurseurs des ARNr 5S défectifs chez *Xenopus laevis*. En effet, ils ont montré que la protéine Ro est aussi complexée avec certaines variantes de l'ARNr 5S chez les oeufs de *Xenopus*. Ces ARN contiennent des mutations et des nucléotides additionnels à l'extrémité 3', comparativement à la séquence d'ARNr 5S normal. Ils ont démontré que la protéine Ro lie spécifiquement les mutants d'ARNr 5S contenant une extension 3' terminale. Ces ARN mutants sont défectifs dans leur maturation et sont éventuellement

dégradés. L'observation que l'autoantigène Ro s'associe spécifiquement avec les précurseurs d'ARNr 5S défectueux suggère que cette protéine pourrait agir sur le contrôle de qualité ou sur une voie d'élimination des ARNr 5S. Pour l'instant, cette première évidence pour le rôle de la protéine Ro n'a été démontrée que chez l'oeuf de la grenouille. Soulignons que l'oocyte de grenouille possède un très grand nombre de gènes (environ 20 000 gènes) pour l'ARNr 5S comparativement à l'humain (1300 copies). De plus, d'autres études doivent être effectuées pour déterminer si les ARN Y sont associés au complexe protéine Ro-ARNr 5S quoique le travail de O'Brien et al. suggère que non.

1.6.3 La protéine Ro52

C'est en 1988 que l'équipe de Ben-Chetrit rapporte que plusieurs sérums possédant des anti-Ro réagissent contre une protéine de 52 kD (p52), en immunobuvardage. Selon eux, p52 se distingue immunologiquement et biochimiquement des protéines Ro60 et La et ferait partie intégrante de la RNP Ro (d'où sa dénomination Ro52) (Ben-Chetrit et al., 1988). Cependant la séquence d'ADNc de p52 n'encode pour aucune région de liaison à l'ARN (Chan et al., 1991; Itoh et al., 1991), et p52 ne semble pas interagir directement avec l'ARN Ro (Pruijn et al., 1991; Rader et al., 1989). Il est alors proposé que cette protéine serait un constituant de la RNP Ro par le biais d'une liaison avec la protéine Ro 60 kD (Slobbe et al., 1992).

Ce n'est que six années après la découverte de «Ro52» qu'il est démontré par des évidences biochimiques et immunologiques que la protéine de 52 kD n'est pas une protéine Ro (Boire et al., 1995, Kelekar et al., 1994). Contrairement aux rapports précédents, il semble maintenant définitif que la protéine p52 n'est pas une composante stable de la RNP Ro sous sa forme antigénique.

D'autres protéines qu'on croyait initialement être associées à Ro (par exemple, la calréticuline) sont aussi reconnues par quelques sérums anti-Ro (Lieu et al., 1988, Rokeach et al., 1991).

1.6.4 Rôle de la ribonucléoprotéine Ro

Le rôle des RNP Ro et de ses composantes reste encore inconnu, mais comme elles sont très conservées à travers l'évolution, il est probable qu'elles jouent un rôle essentiel dans la cellule. La localisation de la RNP Ro demeure aussi controversée. Certains auteurs soutiennent que les RNP Ro sont des composantes cytoplasmiques (Clark et al., 1969; Hendrick et al., 1981; Peek et al., 1993), tandis que d'autres soutiennent que leur localisation est nucléaire (Alspaugh et al. 1976; Harmon et al., 1984; Ben-Chetrit et al. 1988). Étant donné la controverse sur la localisation cellulaire, différentes fonctions biologiques ont été proposées pour les RNP Ro. Les fonctions nucléaires proposées sont un rôle dans la transcription, la maturation et le transport, basé

sur l'interaction avec l'antigène La (Wolin et Steitz, 1984). Aussi, comme on observe une localisation cytoplasmique, quelques fonctions tel un rôle dans la traduction et dans la mise en réserve des ARNm sont aussi proposées. De plus, il n'est pas exclu que les RNP Ro seraient impliquées dans différents processus. Malgré le fait que les particules Ro se retrouvent dans une variété de tissus humains, la RNP Ro montre une hétérogénéité à plusieurs niveaux (Harmon et al., 1984). Par exemple chez les autres espèces, le nombre d'ARN Ro varie de 1 à 4 (Wolin et Steitz, 1984; Harmond et al., 1984; Mamula et al., 1989a) mais jusqu'à maintenant, chacune de ces espèces possède un ARN qui co-migre avec l'ARN hY1 (Mamula et al., 1989a; Pruijn et al., 1993). Il est important de noter que la particule contenant l'ARN hY5 est unique aux cellules humaines (ou du moins aux primates) (Boire et al., 1989). De plus, des différences dans la composition des RNP Ro ont été observées entre les cellules d'une même espèce. En effet, dans les globules rouges humains seulement l'ARN hY1 et hY4 sont immunoprécipités en présence des protéines Ro 60 kD et 54 kD qui se distinguent antigéniquement des protéines Ro de cellules HeLa (Rader et al., 1989; Itoh et al., 1990). Dans les plaquettes sanguines, on retrouve seulement l'ARN hY3 et hY4 ainsi qu'une protéine de 52 kD antigéniquement différente de celle des lymphocytes (Itoh et Reichlin, 1991). De plus la RNP Ro est de 20 à 30 fois moins abondante dans les plaquettes sanguines comparativement aux lymphocytes.

1.7 ANTIGÉNICITÉ DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro

Il est démontré que plusieurs épitopes peuvent être reconnus sur un même autoantigène (Tan, 1989). La particule Ro présente à elle seule plusieurs épitopes situés sur ses régions protéiques; les protéines Ro (60 kD, 52/54 kD) et sur la protéine La. Certains sérums possèdent des autoanticorps dirigés contre un ou plusieurs de ces épitopes (Hendrick et al., 1981,; Mamula et al., 1989b), quoique les anti-La sont presque toujours associés aux anti-Ro (Hardin, 1986; Reichlin, 1986). Les épitopes reconnus sur ces protéines sont linéaires ou conformationnels. Cependant Boire et al., ont montré que certains sérums anti-Ro60 reconnaissent un déterminant conformationnel uniquement et les épitopes conformationnels seraient immunodominants (Boire et al., 1991). S'ajoute enfin à ces observations le fait que parmi les patients possédant des autoanticorps anti-Ro/La, un certain nombre immunoprécipitent seulement la RNP Ro^{hY5}, indiquant que la RNP Ro^{hY5} contiendrait un déterminant antigénique conformationnel unique (Boire et Craft, 1989).

1.8 AUTOANTICORPS ANTI-ARN

Tous les ARN humains sont simple brin et adoptent une structure tertiaire en solution. Dans certains cas, spécialement avec les petits ARN, la structure est déterminée par un appariement intramoléculaire, tandis que la structure des ARN de plus grande taille est influencée par la liaison de protéines à l'ARN. A

cause de l'appariement local des bases, les petits ARN forment habituellement des structures en «stem-loop». Les premières études concernant les anti-ARN datent d'environ 30 ans. Celles-ci démontrent que la reconnaissance de l'ARN est non spécifique mais qu'elle ne résulte pas d'une réaction croisée avec les anti-ADN. Les autoanticorps contre l'ARN sont rapportés dans 60% des patients atteints de LED. Aucune association clinique précise n'est associée avec des autoanticorps. Les anti-ARN sont aussi retrouvés à une faible fréquence chez des patients avec d'autres maladies autoimmunes. Plus récemment, on a mis en évidence des autoanticorps reconnaissant spécifiquement certains petits ARN. Ces anti-ARN coexistent habituellement avec d'autres autoanticorps dirigés contre les protéines associées aux ARN cibles (Hoet et van Venrooij, 1992).

L'équipe de Boire a rapporté l'existence d'une nouvelle spécificité d'autoanticorps liée aux anticorps anti-Ro. Le sérum de deux patients produisant des anticorps anti-RNP Ro contiennent aussi des autoanticorps capables d'immunoprécipiter spécifiquement l'ARN déprotéiné; composante de la RNP Ro^{hY5} ou l'ARN hY5 produit *in vitro* (Boulanger et al., 1995). Les deux patients en question sont atteints de LED. Certaines données suggèrent que l'épitope de l'ARN hY5 est conformationnel. En effet, une digestion enzymatique par la RNase TI (qui clive en 3' des guanosides simple brin), génère 2 fragments appariés; l'un de 27 nt et l'autre de 31 nt (Figure 2). Ces fragments d'ARN demeurent reconnus par les autoanticorps, si et seulement s'ils sont appariés. Une dénaturation à la chaleur produit la séparation de ces 2 fragments

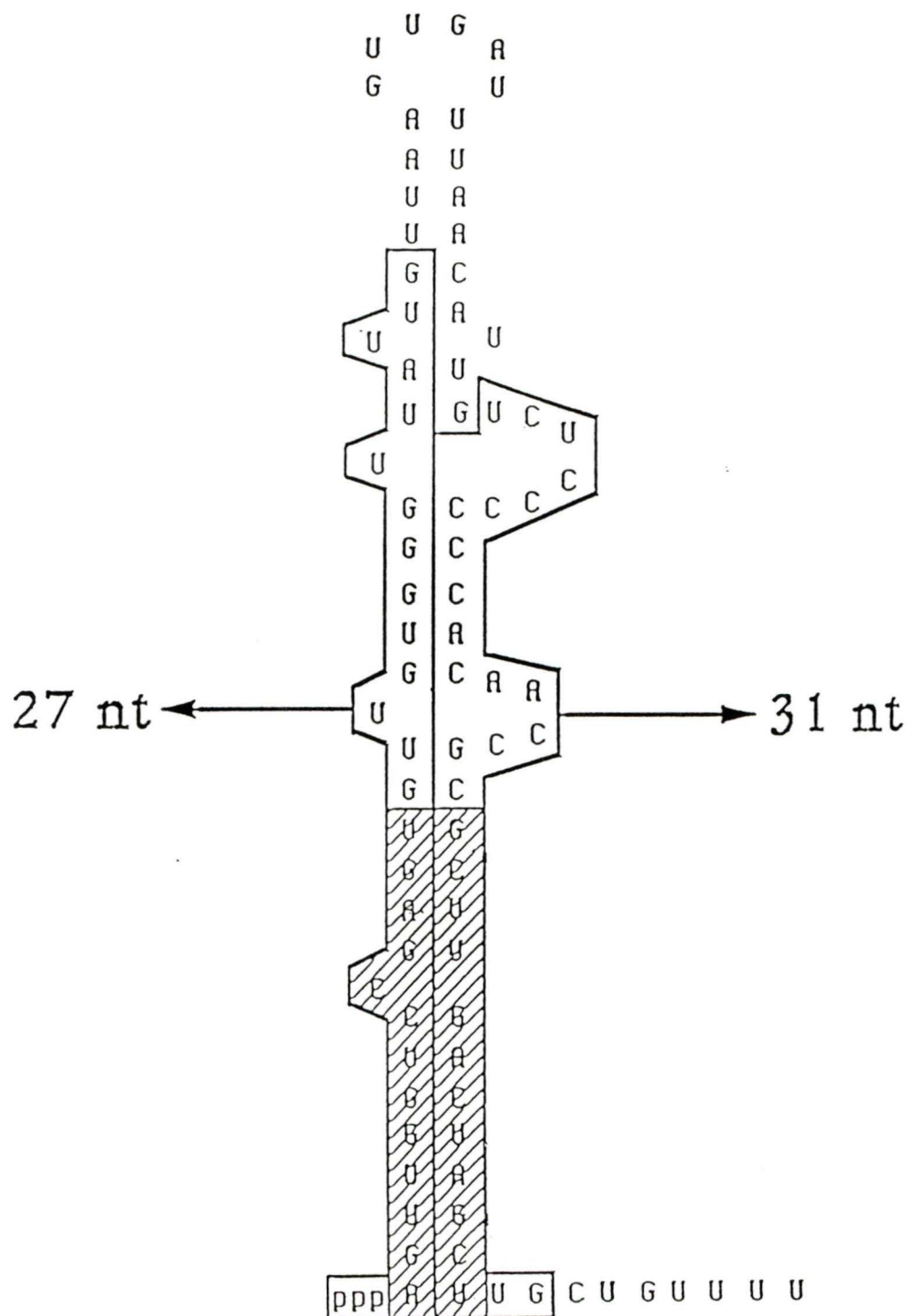


Figure 2. Identification des fragments reconnus par le sérum JW

L'ARN Y5-84 digéré partiellement à la RNase T1 génère deux fragments; l'un de 27 nt et l'autre de 31 nt (Boulanger et al., 1995). La région hachurée correspond aux séquences conservées impliquées dans la liaison de la protéine Ro60.

et chacun d'entre eux, pris séparément, n'est plus reconnu par les autoanticorps. Ceci suggère 1) que l'épitope est conformationnel et 2) que la partie centrale de la molécule ne contribuerait pas à l'épitope. De plus, l'appariement de l'extrémité 5' avec l'extrémité 3' (où se lie la protéine Ro60) ne participerait pas à la formation de l'épitope car cette région est conservée chez les autres ARN hY qui eux ne sont pas immunogènes.

Les aminoacyl-ARNt synthétases sont un groupe d'enzymes cytoplasmiques qui catalysent la liaison de l'ARNt à leur acide aminé respectif. Des autoanticorps dirigés contre au moins 5 aminoacyl-ARNt synthétases ont été rapportés chez des patients atteints de maladies rhumatismales. Les autoanticorps immunoprécipitent les ARNt synthétases et inhibent l'enzyme respectif (Targoff, 1990). Parmi ces anti-aminoacyl-ARNt synthétases, mentionnons les anti-PL-12 dirigés contre l'ARNt-alanyl synthétase. Les sérums anti-PL-12 contiennent des anticorps contre l'ARNt de l'alanine (ARNt^{Ala}) (Bunn et al., 1986). Le site de liaison de l'anticorps anti-ARNt^{Ala} consiste en 7 à 9 nucléotides dans la boucle anticodon et requiert un anticodon intact (Bunn et Mathews, 1987). De plus des autoanticorps dirigés contre les quatre aminoacyl-ARNt synthétases suivants ont été rapportés; pour l'histidine (Miller, 1990 et Bunn, 1991), la thréonine (Mathews, 1984), l'isoleucine (Targoff, 1990) et la glycine (Targoff, 1990). Les autoanticorps anti-thréonyl-ARNt et les anti-histidyl-ARNt synthétases immunoprécipitent le complexe

ribonucléoprotéique contenant l'enzyme et son ARN de transfert; ils reconnaissent la protéine libre, mais non l'ARN seul (Mathews, 1984). La majorité de ces patients produisant des autoanticorps anti-ARNt synthétases souffrent d'une polymyosite, et la majorité ont aussi une atteinte pulmonaire.

Des anti-ARNr 28S ont aussi été détectés chez des patients atteints de LED. Les anti-ARNr 28S reconnaissent un épitope formé d'un fragment de 59 nucléotides au sein de l'ARNr 28S de 4 kb (Uchiumi, 1991; Chu et al., 1991). Cette région de l'ARNr 28S, protégée par la liaison à l'anticorps contre la digestion par la RNase TI, est aussi conservée et se trouve être le centre GTPase de la sous-unité ribosomale 50S. Le clivage du GTP est une étape essentielle de la synthèse protéique au sein du ribosome. De plus les anti-ARN 28S inhibent la liaison des facteurs d'élongation EF-1 α et EF-2 au ribosome. Ces résultats suggèrent donc que les anti-ARNr 28S sont dirigés contre le site actif du ribosome.

D'autres études mettent en évidence l'existence d'anticorps contre l'ARN U1, présents chez environ 40% des sérums anti-snRNP U1 (Wiluz et Keene, 1986; van Venrooij et al., 1990). Les régions épitopiques majeures se trouvent dans les boucles II et IV de l'ARN U1 (Hoet et al., 1992), et ces épitopes seraient conformationnels (Deutscher et Keene, 1988). Ces autoanticorps anti-ARN U1 sont plus souvent présents chez les patients atteints de MTCD. De

plus, le niveau d'anti-ARN U1 corrèle avec les exacerbations de la maladie et cette corrélation ne semble pas exister au niveau des anti-RNP U1 (Hoet et al., 1992a). Aucun des autres ARN U ne semble jouer le rôle d'un autoantigène, jusqu'à maintenant (van Venrooij et al., 1990). Ces résultats suggèrent fortement l'hypothèse que la réponse autoimmune anti-snRNP est dirigée contre l'antigène RNP U1 lui-même. Les anti-ARN U1 sont capables d'immunoprécipiter les RNP U1 à partir d'extraits cellulaires totaux; c'est-à-dire lorsque les protéines reliées à U1 sont associées à l'ARN U1 (Hoet et al., 1994).

Plus récemment, l'équipe de Okano (Okano, 1992) a décrit des autoanticorps dirigés spécifiquement contre la structure «cap» formée par l'ajout de 2,2,7-triméthylguanosine (TMG) à l'extrémité 5' des ARN U (excepté pour U6, qui ne possède pas le «cap» TMG). La structure «cap» TMG joue un rôle essentiel dans le transport des petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP) U1 du cytoplasme au noyau (Fisher et Lührmann, 1990).

1.9 PERTINENCE DE LA RECHERCHE

Les autoanticorps sont de bons outils utilisés en biologie moléculaire. Ils ont permis l'identification de plusieurs nouvelles protéines cellulaires, ils ont aussi permis d'élucider les détails de plusieurs événements intracellulaires, notamment celui de l'épissage des ARN messagers (Tan, 1989; Saitta et Keene,

1992). Les autoanticorps sont utilisés pour la purification et la caractérisation de particules et organelles intracellulaires, pour le clonage d'ADNc codant plusieurs protéines cellulaires clé, et pour la caractérisation d'autoantigènes qui induisent des réactions autoimmunes (Balczon, 1993). De plus, les anticorps anti-ARN font partie d'un système utile pour déterminer la nature de la réponse autoimmune contre les macromolécules cellulaires. Ainsi ces études peuvent fournir des indices clés sur le mécanisme responsable de l'autoimmunité, et spécialement sur la nature de la présentation antigénique. La compréhension de ces phénomènes pourrait rendre possible le développement de thérapies immunosuppressives pour traiter les maladies autoimmunes. Dans notre cas, les anti-ARN hY5 qui constituent une autre forme antigénique des anticorps anti-Ro pourraient également contribuer à mieux définir l'immunogénicité de la particule Ro.

De plus, comme les autoanticorps sont souvent spécifiques à une maladie ou à un groupe restreint de maladies, les autoanticorps fournissent une aide sous forme de marqueur sérologique, confirmant ainsi le diagnostic d'une maladie. Le titre de certains anticorps peut être directement associé avec l'activité de la maladie, comme c'est le cas des anti-ARN U1 présents chez les gens atteints de LED (Hoet et al., 1992). Le système Ro ressemble beaucoup au système U1. Dans les deux cas, des anti-RNP U1 ou Ro ont d'abord été rapportés. Parmi ces sérums, on retrouve un certain nombre qui contiennent aussi des anti-ARN U1

(40%) et anti-ARN hY5 respectivement. Chacun des épitopes ciblés sur l'ARN semble conformationnel. On pourrait donc imaginer que le niveau d'anti-ARN hY5 serait lié aussi dans l'activité de la maladie (comme c'est le cas pour les anti-ARN U1). Si tel était le cas, il serait possible d'utiliser les anti-ARN hY5 comme outil diagnostique dans le but de suivre l'évolution de la maladie.

Les études portant sur les épitopes ciblés sur les ARN par les autoanticorps montrent que les épitopes constituent une partie fonctionnelle de l'ARN. À titre d'exemple, citons les autoanticorps anti-ARNt^{Ala} (alanine) qui sont dirigés contre l'anticodon de cet ARNt (Bunn et Mathews, 1987). En utilisant les anticorps anti-TMG («cap»), il a été démontré que la structure «cap» présente chez tous les snRNP (sauf U6) est responsable du transport des snRNP du cytoplasme au noyau. En déterminant l'épitope ciblé sur l'ARN hY5, par les autoanticorps anti-hY5, on pourrait obtenir des indices sur le rôle potentiel de l'ARN hY5, jusqu'à maintenant inconnu.

1.10 OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le but de cette recherche était de caractériser la spécificité antigénique que représentent les autoanticorps anti-ARN hY5. Nous avons poursuivi les objectifs suivants:

- a) mise au point d'une nouvelle technique (autre que l'IPP) pour détecter d'autres sérums ayant des anti-ARN hY5
- b) vérifier la spécificité de ces autoanticorps vis-à-vis l'ARN hY5
- c) évaluer la fréquence avec laquelle ces autoanticorps sont produits
- d) produire divers mutants de l'ARN hY5
- e) définir le ou les épitopes que ces autoanticorps reconnaissent sur l'ARN hY5
- f) isoler les anti-ARN hY5 spécifiques à partir des immunoglobulines G totales d'un sérum
- g) sous-cloner l'ADNc de l'ARN hY1 et de hY4 de façon à pouvoir les transcrire *in vitro*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CARACTÉRISATION DES SÉRUMS

Les sérums que nous avons utilisés dans cette étude ont été caractérisés par IPP et proviennent de la banque de sérums de l'Unité des maladies rhumatismales du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (C.H.U.S.). Ils ont été prélevés chez des donneurs sains et chez des patients souffrant de collagénose incluant le LED, le syndrome de Sjögren et la polyarthrite rhumatoïde. Les critères utilisés pour diagnostiquer ces maladies sont ceux définis par l'American College of Rheumatology.

2.2 PRODUCTION DES MUTANTS PAR MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE PAR PCR

2.2.1 Plasmide pY5-84

Le plasmide pY5-84 correspond au vecteur pUC19 (Yanish-Perron et al., 1985) contenant l'ADNc antisens de hY5 flanqué par des séquences supplémentaires à chaque extrémité (nécessaires aux manipulations ultérieures), le tout inséré dans les sites de clonage Xba I et Hind III. Le plasmide pY5-84 a été construit par Mme Carole Bélanger (étudiante à la maîtrise, dirigée par les Drs Gilles Boire et Benoît Chabot pour la période 1991-1993) et est représenté à la Figure 3A.

Figure 3A. Schéma de pY5-84 et des ARN produits par ce plasmide

Une séquence de 108 pb correspondant à l'ADNc de l'ARN hY5 et au promoteur reconnu par l'ARN polymérase T7 est insérée dans le plasmide pUC19 aux sites d'enzymes de restriction Xba I et Hind III. (déjà disponible au laboratoire du Dr Gilles Boire; réalisé par Mme Carole Boulanger 1993).

amp ^R :	gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline
P T7 :	séquence promotrice reconnue par l'ARN polymérase T7
—→ :	séquence d'ADN transcrite par l'ARN polymérase T7 après linéarisation du plasmide
----- :	ARN produit

A

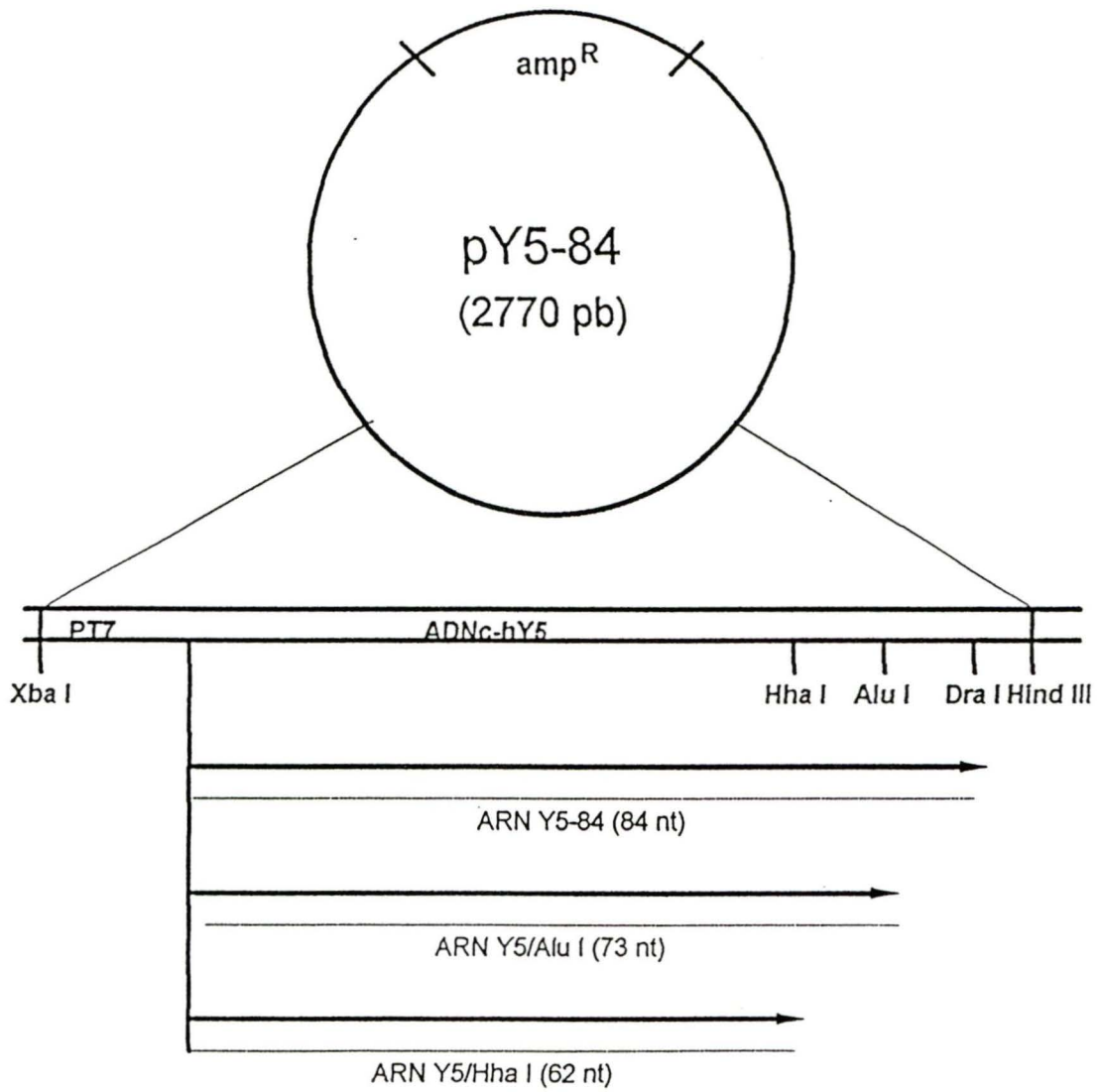


Figure 3B. Le plasmide pY5-80

La structure ne diffère de celle de pY5-84 que par une délétion de 4 nucléotides dans la séquence codante de l'ADNc de l'ARN hY5 (position 58-61) (déjà disponible au laboratoire du Dr Gilles Boire; réalisé par Mme Carole Boulanger, 1993).

Figure 3C. Le plasmide pY5-78

La structure de pY5-78 ne diffère de celle de pY5-84 que par une délétion de 6 nucléotides dans la séquence codante de l'ADNc de l'ARN hY5 (position 47-52).

Figure 3D. Le plasmide pY5-84 "Ouvert"

La structure de pY5-84"O" ne diffère de celle de pY5-84 que par une substitution de 5 nucléotides; 5'-CCCAC-3' par 5'-AAAAA-3', dans la séquence codante de l'ADNc de l'ARN hY5 (position 53-57).

Figure 3.

B pY5-80 (2766 pb):
ARN Y5-80 (80 nt)
ARN Y5-80 / Alu I (69 nt)
ARN Y5-80 / Hha I (58 nt)

C pY5-78 (2764 pb)
ARN Y5-78 (78 nt)
ARN Y5-78 / Alu I (67 nt)
ARN Y5-78 / Hha I (56 nt)

D pY5-84"Ouvert" (2770 pb)
ARN Y5-84"O" (84 nt)
ARN Y5-84"O" / Alu I (73 nt)
ARN Y5-84"O" / Hha I (62 nt)

2.2.2 Production de l'ADNc pour le mutant Y5-78

La production du mutant de délétion pY5-78 a été réalisée à partir de pY5-84 avec la technique de mutagenèse par PCR (Ho et al., 1989). Le laboratoire possédait déjà les 2 oligos flanquants (oligos «A» et «B») de l'ADNc hY5 préalablement synthétisés au laboratoire du Dr. Pierre Bourgaux (Université de Sherbrooke, Sherbrooke). L'oligo «A» (5'-AATCTAGATAATACGACTCACTATAAGTTGGTCCGA-3' (flanquant homologue en 5') contient le site promoteur pour l'ARN-polymérase T7 ainsi que le site de coupure pour l'enzyme de restriction Xba I : site de clonage. L'amorce 5' a été conçue de façon à ce que le premier nucléotide transcrit soit le premier nucléotide de l'extrémité 5'. L'oligo «B» (5'-TTAAGCTTTAAACAGCAAG-3') quant à lui, possède comme site de clonage: Hind III, et correspond à la séquence terminale de l'ADNc qui forme avec les nucléotides suivants, le site de coupure de l'enzyme *Dra I* soit; TTTAAA. Deux oligos contenant la délétion ont été synthétisés: «78-C» (5'-GCGCGGTTGTGGGCAATGT TAAA-3') et «78-D» (5'-TTTAACATTG-CCCACAACCGCGC-3') par la compagnie «General synthesis and diagnostics, Toronto». En utilisant ces amorces, une délétion de 6 nucléotides (position 47-52) est générée à la première étape d'amplification d'ADN (Figure 8). Lors de cette étape d'amplification, 2 PCR sont faits en parallèle: le premier tube comprend les oligos «A» (flanquant homologue) et «78-C» (mutant complémentaire), l'autre tube contient les oligos «B» (flanquant

complémentaire) et «78-D» (mutant homologue). La réaction d'amplification est composée de 10 μ l de tampon PCR (100 mM Tris-Cl [pH 7.5], 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl), 4 μ l 100 mM dithiotréitol, 2.5 μ l 10 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ l 3 mg/ml BSA, 1.5 μ l de chaque oligonucléotide (10 pmoles/ μ l) et d'ADN plasmidique hY5-84 (5 ng) dans un volume final de 100 μ l, recouvert par 60 μ l d'huile minérale. Les tubes sont bouillis 5 min. et 100U d'ADN-polymérase Taq (Pharmacia) est finalement ajouté. Suite à cette première amplification en parallèle, une deuxième amplification est réalisée, en utilisant cette fois-ci 10 μ l de chacun des 2 produits de «PCR-1ère amplification», et 1 μ l de chacun des oligos flanquants «A» et «B». Ainsi l'ADN nouvellement synthétisé sert de brin-mère pour une seconde amplification. Le reste de la réaction d'amplification se fait de la même façon que décrite précédemment. Toutes les réactions de PCR ont été réalisées selon le protocole standard de PCR Touchdown; 18 cycles, présenté à l'Annexe I (Don et al., 1991) sur un appareil de PCR de type PTC-100™ (MJ Research, Inc.).

2.2.3 Production de l'ADNc du mutant Y5-84«Ouvert»

La production du mutant de substitution pY5-84«ouvert» a été réalisée de la même façon que pour le mutant de délétion pY5-78. Deux oligonucléotides contenant la substitution désirée ont été synthétisés par la compagnie «General synthesis and diagnostics, Toronto». L'oligo «84o-C» (5'-CAAGCGCGGTTAAAAAGGGAGACAATG-3') correspond au mutant

complémentaire, chez lequel la séquence 5'-AAAAA-3' remplace en fait la séquence initiale: 5'-CCCAC-3' (position 53-57). L'oligo «84o-D» (5'-CATTGTCTCCCTTTTAAACCGCGCTTG-3') correspond au mutant homologue et contient par conséquent, la séquence de substitution homologue: 5'-TTTTT-3' pour la même position (Figure 8). L'amplification a été réalisée en 2 étapes, par réactions de PCR, comme décrit précédemment à la section 2.2.2 (production du mutant pY5-78), en utilisant les mêmes oligos flanquants; «A» et «B».

2.2.4 Clonage de l'ADNc correspondant aux mutants

Pour chacun des 2 mutants, la séquence d'ADNc amplifiée est digérée par les enzymes dont les sites de coupure sont présents sur chacun des oligos flanquants, soit Xba I à l'extrémité 5' de l'oligo «A» et Hind III à l'extrémité 3' de l'oligo «B». Les 2 ADNc ainsi digérés sont clonés séparément dans le vecteur pUC19 linéarisé par les 2 mêmes enzymes. Les conditions enzymatiques sont celles suggérées par le manufacturier (Pharmacia). Le clonage se fait par la technique d'agarose à base température de fusion («low melting agarose»), c'est-à-dire; les séquences d'ADNc digérées sont purifiées par migration sur gel d'agarose 0.6% à base température de fusion (Gibco BRL, Gaithersburg). Les bandes amplifiées par PCR sont identifiées par coloration au bromure d'éthidium puis découpées. L'agarose est fondue à 42°C. L'ADN est ligué directement dans le vecteur ouvert, purifié quant à lui par chromatographie d'affinité (méthode «Geneclean» de BIO 101 Inc., La Jolla, CA). La réaction de ligation pour

laquelle le ratio vecteur:insert était de 1:6, s'effectue à 17°C pendant 16 heures avec l'ADN-ligase T4 (Pharmacia) dans le tampon fourni par le fournisseur. Les plasmides obtenus, soit le pY5-78 et le pY5-84«O» décrits sont présentés à la Figure 3C et 3D. Ces derniers sont finalement introduits dans des bactéries rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium (Ausubel et al., 1992) de la souche *E. coli* JM109 (Yanish-Perron et al., 1985). La transformation a été faite de la façon suivante. Un demi volume de ligation (0.1 à 0.2 µg d'ADN) est ajouté à 50 µl de cellules compétentes, le tout incubé pendant 10 min. sur la glace. Le mélange est chauffé à 37°C pendant 5 min. puis 100 µl de milieu de culture Luria-Brot est ajouté au mélange. Le tout est incubé à 37°C durant 1 heure. Ce mélange est étalé sur les plaques de pétris (milieu Luria-Brot, 1.5% d'agar, 10 µg/ml ampiciline) recouvertes d'une solution contenant 16 µl X-gal 50 mg/ml et 6.5 µl d'IPTG 500 mM dans 100 µl de Luria-Brot. Les plasmides ayant transformés les bactéries sont isolés par mini-préparation selon la méthode de lyse alcaline (Sambrook et al., 1989).

2.2.5 Séquencage de l'ADN

Pour vérifier le résultat des mutations produites, les plasmides sont séquencés selon la technique décrite par Sanger (Sanger et al., 1977). Le «T7 Sequencing™ Kit» (Pharmacia) est utilisé avec 10 mCi/ml α-³⁵S-dATP (Amersham). Les échantillons sont fractionnés sur gel d'urée-polyacrylamide de 10% sur un appareil Sequi-GenII de Bio-Rad (Mississauga, Ontario). Le gel est

séché 1 heure sous vide à 80°C avant d'être exposé sur autoradiogramme à température ambiante.

2.2.6 Mutant pY5-80

Nous avons utilisé le plasmide pY5-80, déjà disponible au laboratoire (construit par Mme Carole Boulanger). Ce plasmide correspond au vecteur pUC19 contenant l'ADNc correspondant à l'ARN mutant hY5-80. L'ADNc pY5-80 contient une délétion de 4 nucléotides (position 58-61). Sur le schéma de l'ARN hY5-84, la délétion correspond à une boucle de 4 nucléotides retrouvée à droite de la molécule (Figures 3B et 8).

2.3 SOUS-CLONAGE DE L'ADNc DE hY1 ET hY4

Dans le but de pouvoir transcrire *in vitro* les ARN hY1 et hY4, nous avons sous-cloné l'ADNc respectif en y ajoutant un site promoteur à l'ARN polymérase T7, et un site de coupure en 3'. Pour ce faire, nous avons utilisé les plasmides originaux gracieusement offerts par le Dr Charles A. O'Brien (Yale University School of Medicine, New Haven). L'ADNc (plasmide original) de hY1 est inséré dans le plasmide pBR322 dans les sites de clonage EcoR I / Pvu II (Wolin et Steiz, 1983). L'ADNc de hY4 (plasmide original) quant à lui, est contenu dans les sites Hind III / EcoR I du vecteur pUC18 (O'Brien et Harley, 1990). Les deux ADNc en question ont été sous-clonés dans le plasmide pUC19 de la

façon suivante. L'oligo suivant Y1/Y4-«A» (5'-GGGAATTCTAATACGACTC-ACTATAGGCTGGTCCG-3') a été utilisé pour s'hybrider à l'extrémité 5' de l'ADNc de hY1 et de hY4 (ces 2 extrémités étant identiques). Cet oligonucléotide contient un **site pour l'ARN-polymérase T7** ainsi qu'un site de restriction pour l'enzyme Eco RI (site de clonage en 5'). Les deux oligos s'hybridant à l'extrémité 3' sont Y1-«B» (5'-GGAAAGCTTTAAGAC-TAGTC-3') pour l'ADNc correspondant à hY1 et Y4-«B» (5'-GGAAAGCTTTAAGCCAGTCA-3') pour celui correspondant à hY4. Les deux oligos «B» contiennent un site de restriction pour l'enzyme Hind III (site de clonage 3') et un site pour l'enzyme de restriction Dra I, dans le but de produire un ARN possédant une extrémité 3' identique à celle trouvée *in vivo*. Tous les oligonucléotides présentés ici ont été synthétisés au laboratoire du Dr Pierre Bourgaux (Université de Sherbrooke, Sherbrooke). Les conditions pour les réactions de PCR, de clonage, de transformation et de séquençage sont celles décrites aux sections 2.2.2, 2.2.4 et 2.2.5. Cette fois-ci, le PCR utilisé est le modèle GeneAmp 2400 de la compagnie Perkin-Elmer Cetus. Le programme utilisé est le suivant : 1) 5 min. à 94°C, 2) 1 min. à 94°C, 3) 2 min. à 35°C, 4) 3 min. à 72°C, 5) répéter les étapes 2) à 4) 35 fois, 6) 10 min. à 72°C et 7) conserver à 4°C.

2.4 SYNTHÈSE *IN VITRO* ET PURIFICATION DES ARN

Les plasmides sont soumis à la digestion par différentes enzymes de restriction, de façon à produire des ADNc de différentes longueurs. Ces ADN, après transcription *in vitro*, génèrent donc des ARN de pleine longueur ou tronquées à leur extrémité 3' (voir les enzymes de restriction utilisées versus les transcrits produits aux Figures 3 et 8. Les plasmides digérés sont purifiés par chromatographie d'affinité (méthode «Geneclean») et transcrits par 2 méthodes de réaction de synthèse distinctes, selon le besoin. La première méthode permet l'obtention d'ARN très fortement radiomarkée. La réaction de synthèse se fait en présence de 5 μ l de tampon 5X (Promega, Madison, fourni avec l'achat de la polymérase), 2.5 μ l DTT 100 mM, 5 μ l rNTP 2.5 mM (rUTP, rATP, rGTP), 3 μ l rCTP 100 μ M, 1 μ g d'ADN linéaire, 10U RNAGuard, 2 μ l 20 mCi/ml [α -³²P]-CTP (Amersham), 40U d'ARN-polymérase T7 (Promega) dans un volume final de 25 μ l. Le tout est incubé toute la nuit à 37°C. La seconde méthode est réalisée avec le «Kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System, T7» (Promega) en ajoutant la quantité désirée de [α -³²P]-CTP dans un volume final de 50 μ l. Cette dernière méthode a été utilisée pour la production d'une grande quantité d'ARN froid ou faiblement radiomarké. Pour les deux méthodes en question, 1U/ μ g de DNase I est ajouté au cours des 15 dernières min. d'incubation. Un volume égal de colorant à la formamide 80% est ensuite ajouté, l'échantillon est bouilli 90 sec. et placé sur un gel dénaturant (voir

matériels et méthodes, section 2.7). Après l'électrophorèse, le gel est exposé sur un film Kodak XAR-5 (de 1 à 60 min., selon la quantité de radioactivité utilisée) ou visualisé à l'ultra-violet 254 nm, sur plaque de silice (Whatman pour VWR Scientific, Ville Mont-Royal, Québec) dans le cas d'ARN non-radiomarké, où une bande ombragée correspond à la bande d'ARN; l'ARN présente dans le gel empêche les rayons UV de passer à travers le gel. La bande d'ARN, repérée par l'une ou l'autre méthode est excisée du gel qui est alors réduit en pièces à l'aide d'une tige de verre enduite de silicone. L'ARN est élué du gel avec 400 μ l d'une solution de 0.3 M acétate de sodium et 0.2% SDS, en agitant sur agitateur rotatif pendant 3 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4 °C. Le surnageant récolté est purifié par extraction au PCA (phénol : chloroforme : alcool isoamylique ; 50:50:1 contenant 0.2% de 8-hydroxyquinoline), en présence de 30 μ g d'ARNt et l'ARN est finalement précipité à l'éthanol 100%. Les ARN ainsi produits sont gardés à -80°C en culot jusqu'à utilisation ou dans le tampon NET-2 (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.05 % Nonidet P-40) après une première utilisation. La technique d'isolation et de purification d'ARN est tirée du volume: «RNA processing : a practical approach» (Chabot et al., 1994).

2.5 GEL DE RÉTENTION

Le gel de rétention étant un gel de polyacrylamide natif, il permet de détecter les complexes anticorps-antigène qui présentent un retard de migration comparativement à l'antigène seul. La formation du complexe anticorps-antigène se fait dans 4.5 μ l de tampon de NET-2 auquel sont ajoutés 2 mM de $MgCl_2$, 1% de alcool polyvinylique, 5 mM dithiotréitol, 40 U/ml de RNAGuard (Pharmacia), 3 mg/ml d'ARNt de levure. L'ARN transcrit *in vitro* et radiomarké (l'antigène) est ajouté à ce tampon en plus de la source d'anticorps, soit; 1 μ l de sérum ou environ 30 ng d'immunoglobulines préalablement isolées sur capsule de protéine A (Mac Capsules Protein A No. 11037, Amicon). Une incubation de 15 min. sur glace est suffisante pour que la formation du complexe ait lieu. Suite à l'incubation, on ajoute 0.25 mg/ml d'héparine à l'échantillon pour diminuer les interactions non spécifiques en plus de 0.25 volume de colorant au sucrose (0.25% xylène cyanol et 40% sucrose). Le gel (de 0.75 mm) composé de 8% polyacrylamide (acrylamide, N,N méthylène-bis-acrylamide; 80:1), et d'un tampon d'électrophorèse Tris-Glycine (50 mM Tris-50 mM glycine à pH 8.8), est polymérisé en ajoutant 10 μ l de persulfate d'ammonium et 0.6 μ l de TEMED pour chaque ml de solution. Une pré-électrophorèse de 15 min. à 140 volts est requise. Le dépôt des échantillons est suivi d'une électrophorèse au même voltage. L'ARN libre ou retardé par les anticorps est ensuite révélé par autoradiographie.

2.6 IMMUNOPRÉCIPITATION DE L'ARN

L'IPP débute par la liaison des immunoglobulines sur la protéine A (ou la protéine G), couplée à des billes de sépharose CL-4B (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ). Cette liaison est effectuée par une incubation de 10 μ l de sérum en présence de 3 mg de billes de protéine A-Sépharose dans 500 μ l de tampon IPP (10 mM Tris [pH 7.5], 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet P40), sous agitation à 4°C, pendant 1 heure. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec le tampon IPP, 2 fois avec le tampon NET-2 et resuspendues dans 300 μ l de tampon NET-2. L'ARN transcrit *in vitro* (l'antigène) est ajouté aux billes et le tout est incubé 1 heure à 4°C. L'incubation est suivie de 6 lavages avec le tampon NET-2. Les billes sont resuspendues dans ce même tampon auquel sont ajoutés : 0.85% de SDS, 300 mM d'acétate de sodium et 0.1 mg/ml de glycogène. L'extraction de l'ARN retenu sur les billes se fait par PCA. L'ARN est ensuite précipité avec 2.5 volume d'éthanol 100%, à -80°, pendant 1 heure. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70%, séché sous vide, et dissous dans le colorant à la formamide (10 mM EDTA [pH 8.0], 1 mg/ml xylène cyanol, 1 mg/ml de bleu de bromophénol dans 80% de formamide).

2.7 ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'URÉE-POLYACRYLAMIDE

Pour identifier les ARN radiomarqués qui ont été immunoprécipités, ceux-ci sont bouillis 90 sec. dans 1 volume de colorant à la formamide, puis déposés sur gel dénaturant composé d'urée (7M), de polyacrylamide 10% (acrylamide, N, N méthylène-bis-acrylamide; 29:1) et de tampon TBE (90 mM Tris, 10 mM EDTA [pH 8.0], 89 mM acide borique). La polymérisation du gel est provoquée en ajoutant 5 μ l de persulfate d'ammonium 10% et 0.5 μ l de TEMED pour chaque ml de solution. La dimension des gels varie selon les besoins.

2.8 PRÉDICTION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN

Pour prédire la structure secondaire adoptée par une molécule d'ARN, nous avons soumis sa séquence au programme informatisé MULFOLD version 2.0 (Zuker et Jeager, 1989; Freiser et al., 1986) sur MacIntosh disponible au laboratoire du Dr Jean-Pierre Perreault (Université de Sherbrooke, Sherbrooke).

2.9 RECONNAISSANCE DE L'ADN

La technique de gel de rétention (section 2.5) a été utilisée ici dans le but de vérifier si les autoanticorps anti-ARN hY5 ont la capacité de reconnaître une portion de l'ADN correspondant. La technique demeure la même mais ici l'antigène utilisé est un oligonucléotide d'ADN simple brin, correspondant aux

20 derniers nucléotides situés à l'extrémité 3' de l'ARN hY5, soit à la position 64–84 (synthétisé par la compagnie «General synthesis and diagnostics» à Toronto). Celui-ci est marqué en 5' par la polynucléotide kinase T4 (Pharmacia) à l'aide de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, selon la technique suggérée par le manufacturier. Suite à la réaction de kinase, l'échantillon auquel on ajoute 400 μl de NET-2, est ultrafiltré sur Microcon 3000 (Amicon, Beverly) dans le but d'éliminer le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ non-incorporé, ainsi que le milieu réactionnel. Les tubes Microcon 3000 permettent d'éliminer les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 3000 Da en les laissant passer à travers le filtre. Des centrifugations successives (2 à 4) de 10 min. à 10000 RPM sont suffisantes pour ramener le volume final à environ 100 μl . L'oligonucléotide radiomarké ainsi nettoyé est maintenant prêt pour être utilisé en gel de rétention. La source d'anticorps utilisée est le sérum JW.

2.10 PURIFICATION DES AUTOANTICORPS ANTI-ARN hY5

Nous avons mis au point une méthode basée sur la forte affinité qui existe entre la biotine et la streptavidine, dans le but d'isoler les immunoglobulines qui reconnaissent spécifiquement l'ARN hY5.

2.10.1 Production de l'ARN-biotinylé

Celle-ci consiste à produire de l'ARN hY5 *in vitro* en utilisant le kit de transcription «RiboMAX™» (section 2.4 des Matériels et Méthodes). Le protocole de base demeure le même, cependant on utilise une quantité variable de Biotine-21-dUTP (Clontech Laboratories, Inc., Mississauga) (présenté en annexe) en plus de la quantité normale d'UTP de 5 mM dans un volume final de 25 µl. Pour nos besoins nous avons utilisé des rapports de 1/10 et de 4/25 d'UTP-biotinylé/UTP. En guise de contrôle négatif, une transcription identique mais sans biotine est réalisée en parallèle. Uniquement pour la mise au point de la méthode, une faible quantité (0,5 à 2 µM final) de [α -³²P]-CTP (Amersham) est incorporée dans le mélange transcriptionnel, dans le but de suivre l'ARN.

2.10.2 Essai de «dot-blot»

Pour s'assurer que l'ARN est bel et bien biotinylé, un essai de «dot-blot» simplifié est utilisé. Celui-ci consiste à déposer une partie de l'échantillon d'ARN purifié (environ 2%) sur une membrane de nitrocellulose de type Membrane-N+ (Amersham). La purification a pour but d'éliminer le [α -³²P]-CTP et l'UTP-biotinylé non-incorporés, ainsi que le milieu de réaction. Elle se fait par des centrifugations successives de 10 min. à 10000 RPM de l'échantillon avec ajout de NET-2, dans des tubes Microcon 3000. Un contrôle positif, UTP-biotinylé (1×10^{-3} µmole), et un contrôle négatif, l'ARN hY5 sans biotine, sont aussi ajoutés sur la membrane. On laisse sécher les échantillons qui sont ensuite

fixés sur la membrane par une incubation de 5 min., dans une solution de 0.05 N NaOH, avec agitation à température ambiante. Le rinçage de la membrane se fait dans une solution de SSC 2X (300 μ M NaCl, 30 μ M de sodium acétate) durant 15 min. La membrane est ensuite incubée dans une solution de NET-2 contenant de la peroxidase conjuguée à la streptavidine (concentration finale 1X) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Mississauga). L'incubation dure de 1-2 heures à température ambiante avec agitation et permettra à la peroxidase de se lier à la biotine via la streptavidine. Cette incubation est suivie de 8 lavages au tampon NET-2. La révélation se fait par l'ajout du substrat; 0.03 g de 4-chloro-1-naphtol (Sigma) dissous dans 10 ml de méthanol, complété avec de l'eau jusqu'à un volume final de 50 ml, auquel on ajoute 20 μ l de peroxyde d'hydrogène 30% (Fisher). La réaction est presque instantanée et on doit rincer (2-3 fois) la membrane à l'eau pour l'arrêter. Une coloration mauve de l'échantillon indique la présence de biotine.

2.10.3 Reconnaissance de l'ARN biotinylé

Des contrôles ont été réalisés afin de vérifier que la biotine présente sur l'ARN hY5 n'empêche pas la reconnaissance de l'ARN par les autoanticorps. Les ARN hY5-biotinylés (rapport 1/10 et 4/25 d'UTP-biotinylé/UTP) sont testés en IPP et en gel de rétention en utilisant soit un sérum total soit des immunoglobulines G préalablement isolées sur capsule de protéine A (Mac Capsules Protein A, Amicon).

2.10.4 Vérification du lien biotine–streptavidine

Pour s'assurer que l'ARN–biotinylé se lie bien à la streptavidine, un essai d'affinité en suspension est effectué, en utilisant un protocole établi d'après celui utilisé pour l'isolation des anti–ARN U1 (Hoet et al.,1993). L'ARN–biotinylé radiomarké et l'ARN radiomarké seulement sont mis séparément en présence de 100 µl de streptavidine immobilisée sur billes d'agarose (#S1638, Sigma). Le tout est agité pendant 1h à 4°C. La radioactivité de départ est mesurée sur compteur gamma (Bioscan/QC). Les billes subissent ensuite plusieurs lavages au tampon IPP (10 mM Tris [pH 7.5], 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet P40), et la quantité de radioactivité, présente dans le culot (billes) et dans le surnageant, est mesurée après chaque lavage. Nous devons nous assurer que le tampon utilisé ultérieurement lors de l'élution des anticorps, éluera seulement les IgG anti–hY5, sans briser le lien biotine/streptavidine. Pour ce faire, la colonne est lavée 3 fois avec le tampon d'élution, soit 0.15 M glycine pH 2.3. La quantité de radioactivité est aussi mesurée après chaque lavage.

2.10.5 Purification des autoanticorps anti–ARN hY5

Finalement, une fois la mise au point terminée, la colonne d'affinité en suspension, biotine–streptavidine non–radioactive est préparée. L'étape du couplage biotine/streptavidine et les premiers lavages se font comme décrit précédemment. Des quantités variables d'IgG du sérum JW sont ajoutées (1,5 mg et 5 mg d'IgG). Le volume final est complété à 600 µl par la solution de

NET-2 contenant 40U de RNAGuard et 5 mM de DTT. Cette dernière incubation se fait sous agitation pendant 1h, à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec la solution IPP. L'élution des IgG a été réalisée à 2 reprises, chacune d'une durée de 1h à température ambiante à l'aide du tampon 0.15 M glycine pH 2.3 contenant 0.1 µg/ml de BSA. L'éluat est neutralisé immédiatement avec 30 µl (2X15 µl) de Tris pH 8.9. Les anticorps ainsi obtenus sont concentrés sur Microcon 3000 et testés en gel de rétention.

3. RÉSULTATS

Dans cette partie, nous décrirons la caractérisation des autoanticorps dirigés spécifiquement contre l'ARN hY5, la composante ARN de la RNP Ro^{hY5}. Les résultats seront présentés de façon à démontrer 1) la mise au point de deux techniques de détection de ces autoanticorps dans les sérums de patients, 2) leur spécificité anti-ARN hY5, 3) leur prévalence dans les sérums de patients et 4) la caractérisation des deux épitopes contre lesquels ils sont dirigés principalement.

3.1 RECONNAISSANCE SPÉCIFIQUE DE L'ARN hY5 PAR DES AUTOANTICORPS; PREMIÈRE ÉVIDENCE

Des travaux antérieurs avaient démontré la reconnaissance spécifique de l'ARN hY5 par des anticorps présents chez 2 sérums (JW et MD) qui reconnaissaient à la fois les RNP Ro (hY1-5), et l'ARN hY5 (Boire et Craft, 1989; Boulanger et al., 1995). La reconnaissance des RNP Ro a été démontrée par IPP à partir d'un extrait cellulaire marqué au ³²P. Une fois cet extrait déprotéinisé par traitement au phénol-chloroforme, une nouvelle IPP des acides nucléiques démontrait la reconnaissance spécifique de l'ARN hY5. Les 2 types d'autoanticorps, soit les anti-ARN hY5 et les anti-RNP Ro sont d'isotype G étant donné leur affinité, via leur partie Fc, pour les billes de protéine A utilisées comme agent adsorbant lors de ces IPP. Les 2 patients, soit JW et MD, étaient

atteints de LED ayant débuté à l'adolescence. Seuls ces 2 patients semblaient immunoprécipiter l'ARN hY5.

3.2 DÉTECTION ET PRÉVALENCE DES SÉRUMS PRODUISANT DES ANTI-ARN hY5

Afin d'identifier d'autres sérums ayant des autoanticorps anti-ARN hY5, une nouvelle technique a été mise au point pour notre système; le gel de rétention. Cette technique est beaucoup plus rapide que l'IPP et permet donc de tester plusieurs sérums à la fois. Elle pourrait être également plus sensible et plus facile à quantifier. Les différents sérums sont incubés à 4°C en présence d'ARN hY5 transcrits *in vitro* et marqués au ^{32}P . Le tout est ensuite déposé sur un gel natif, suivi d'une électrophorèse, où la présence d'anti-ARN se révèle par une bande retardée dans le haut du gel, visible sur autoradiogramme (Figure 4). Par cette technique, on a dénombré 10 sérums sur 44 (23%) qui possédaient des anti-hY5 parmi les sérums anti-RNP Ro positifs. Parmi ces sérums, on retrouve les sérums JW et MD, déjà connus comme étant hY5 positifs (Figure 4, Tableau 1). Les 10 patients ayant des anticorps anti-hY5 produisent aussi des anti-RNP Ro (testés en IPP) seuls ou associés avec d'autres autoanticorps tel les anti-La. La prévalence pour les anti-hY5 passait donc de 10% par la technique d'IPP à 23% par la technique de gel de rétention.

3.3 SPÉCIFICITÉ DES SÉRUMS ANTI-ARN hY5 IDENTIFIÉS PAR GEL DE RÉTENTION

Le gel de rétention utilise un excès d'ARNt froid par rapport à l'ARN hY5 radiomarké (un rapport froid/radiomarké d'environ 10^6) et de l'héparine ($1.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pour minimiser la reconnaissance non-spécifique anticorps/ARN. De plus, parmi les sérums ne produisant pas d'anti-RNP Ro, soit les sérums avec d'autres autoanticorps (12 sérums) et les sérums normaux (6 sérums), on n'en retrouve aucun avec des anti-hY5 (Tableau 1, Figure 4; pistes 7 et 8). Il est important de mentionner que la reconnaissance de l'ARN hY5 par les sérums est aussi obtenue lorsqu'on utilise les IgG purifiées sur protéine A de ces mêmes sérums (JW et MD) (Figure 20). Ainsi le phénomène selon lequel l'ARN hY5 est retardé en gel de rétention est réellement causé par les anti-ARN hY5 présents dans le sérum et non par la présence d'antigène Ro potentiellement présent dans le sérum qui seraient reconnu par les anti-Ro également retrouvés dans ces sérums. Malgré ces observations, on devait tout de même vérifier que la reconnaissance des sérums anti-ARN hY5 était spécifique. Pour s'assurer que la technique de gel de rétention était plus sensible et non moins spécifique que celle d'IPP, nous avons repris les sérums dits hY5 positifs (Figure 4) testés en gel de rétention, mais cette fois-ci avec l'ARN hY1 transcrit *in vitro* et marqué au ^{32}P . Aucun des sérums hY5 positifs ne reconnaît l'ARN hY1, confirmant donc la spécificité des anti-hY5. Une bande faiblement retardée est visible pour chacun des sérums (Figure 5; pistes 2 à 8), mais elle est causée par une interaction non-

Figure 4. Détection des sérums produisant des autoanticorps anti-hY5 en gel de rétention

L'ARN qui forme des complexes avec les anticorps est retardé sur le gel. Différents sérums testés vis-à-vis l'ARN hY5-84 sur gel de rétention 8%. Les pistes correspondent aux sérums suivants : Piste 1; aucun sérum, piste 2; JW, piste 3; MD, piste 4; RD, piste 5; JDB, piste 6; MCD, piste 7; RS et piste 8; un sérum normal. Les sérums hY5 positifs (pistes 2 à 6) possèdent aussi des autoanticorps contre les RNP Ro (testés en IPP). Le sérum RS sert de contrôle négatif (piste 7) il est connu pour posséder des autoanticorps anti-Ro et des anti-ARNt (testé en IPP).

⇒ : l'ARN hY5-84 lié à l'anticorps anti-ARN hY5

hY5-84

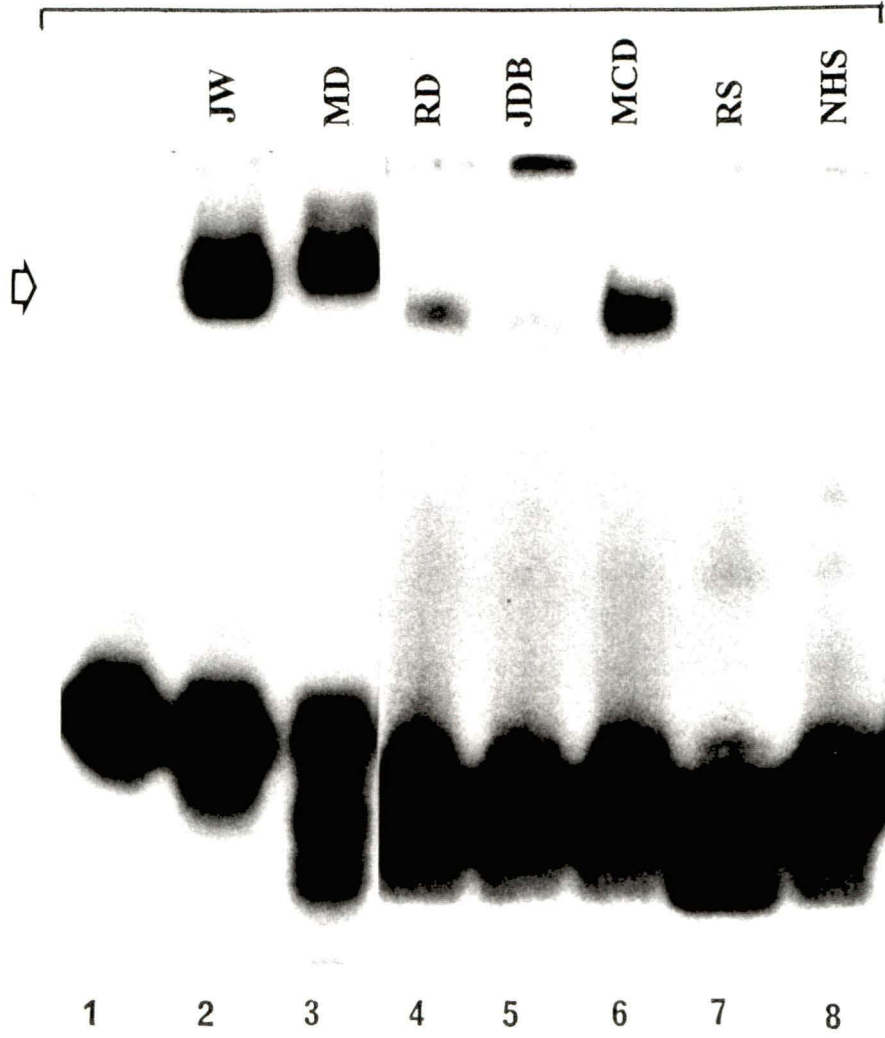


Tableau 1. Identification de sérums contenant des autoanticorps anti-ARN hY5, en gel de rétention

Nombre de sérums analysés	Spécificité des sérums en IPP (anti-RNP)	Nombre de sérums anti-ARN hY5	Nom et # des prélèvements
25	Ro	7	<u>JW</u> * MD #8688 MCD #11358 GD #13229 JDB #13225 SM #12546 JB #6863
18	Ro-La	2	MN #13070 PR #13092
1	Ro-ARNt	1	RD #13171
12	Autres	(-)	
6	NSH	(-)	

IPP: immunoprécipitation

(-) : négatif

* : plusieurs prélèvements différents ont été analysés

souligné : sérum comportant des anti-ARN hY5 en immunoprécipitation, sur billes de protéine A

Figure 5. Spécificité des sérums anti-ARN hY5

Les mêmes sérums de la Figure 4 sont testés en gel de rétention vis-à-vis l'ARN hY1. La piste 1 correspond à l'ARN hY1 seul. Les pistes 2 à 6 correspondent à différents sérums hY5 positifs en gel de rétention. Les pistes 7 et 8 contiennent des sérums contrôles négatifs; RS (piste 7) est connu pour posséder des anti-Ro et des anti-ARNt (testé en IPP), ainsi qu'un sérum normal NHS (piste 8).

hY1

JW

MD

RD

JDB

MCD

RS

NHS



spécifique étant donné que cette faible bande est présente même chez le sérum normal NHS (Figure 5; piste 8).

3.4 CLONAGE DES ADNc CORRESPONDANTS AUX ARN hY1 ET hY4

Comme mentionné ci-haut, afin de vérifier la spécificité des anti-ARN hY5, nous avons testé les sérums hY5 positifs avec l'ARN hY1, en gel de rétention. Pour parvenir à produire l'ARN hY1 *in vitro*, nous avons sous-cloné l'ADNc correspondant à l'ARN hY1. En effet, le plasmide original (offert par Dr Charles A. O'Brien) correspond à l'insert d'ADNc codant pour l'ARN hY1, cloné dans le plasmide pBR322, dans les sites de clonage Eco RI/Pvu II (Wolin et Steitz, 1983) et ne permet pas la transcription. Ce plasmide a été utilisé pour amplifier par PCR, l'ADNc de hY1 à l'aide de 2 amorces flanquantes. L'amorce en 5' contient le site promoteur pour l'ARN polymérase T7 permettant la transcription *in vitro* de cet ADNc, à partir du premier nucléotide 5'. L'oligonucléotide 3' quand à lui contient le site de digestion pour l'enzyme Dra I; site utilisé de façon à donner une extrémité 3' de l'ADNc hY1 qui, après digestion avec Dra I et transcription produira un ARN Y1 (de 112 nucléotides) sans nucléotide supplémentaire en 3'. L'amplification se fait par PCR comme décrit dans la section 2.2.2 des Matériels et Méthodes. L'ADNc amplifié et digéré est ligué dans le plasmide pUC19 par la technique d'agarose à basse température de fusion.

Les mêmes étapes ont été suivies pour produire le plasmide pY4-95. Ce plasmide correspond en fait au plasmide pUC19 contenant l'insert de l'ADNc pour hY4 bornés en 5' du site promoteur pour l'ARN polymérase T7 et du site de restriction Dra I en 3'. La production du plasmide pY4-95 (pour un ARN Y4 de 95 nt) a été rendue possible grâce au plasmide original; insert de l'ADNc pour hY4 cloné dans les sites Hind III/Eco RI de pUC18 (O'Brien et Harley, 1990) offert par Dr Charles A. O'Brien. Les nouveaux plasmides pY1-112 et pY4-95 une fois sélectionnés et isolés, sont séquencés pour s'assurer de l'authenticité du matériel. Les Figures 6 et 7 nous montrent les résultats du séquençage de l'ADNc de pY1-112 et de pY4-95.

Le séquençage du plasmide pY1-112 révèle la délétion d'un nucléotide guanosine à la position 13, probablement dû à un artefact de PCR. En effet, cette délétion ne fait pas partie de l'oligonucléotide 5' et se retrouve aussi sur le brin sens (résultat non-montré). L'ARN hY1 a été produite à partir de ce plasmide nommé dorénavant pY1-112 Δ G13, et testé avec les sérums anti-ARN hY5 positifs, en gel de rétention (Figure 5). L'ARN Y1-112 Δ G13 doit adopter une structure secondaire très semblable à celle de hY1-112. Le séquençage du plasmide pY4-95 confirme la nature du clone attendu, et ce sans aucune erreur de PCR (Figure 7). Le plasmide pY4-95 n'a pas été utilisé pour produire l'ARN Y4-95. Les plasmides pY4-95 et pY1-112 Δ G13 ont été construits dans le but de produire les ARN correspondants qui seront utilisés en outre comme contrôle

Figure 6. Séquençage de l'ADN du plasmide pY1-112

A) Les lignes 1 à 4 représentent la séquence de l'ADN (brin sens) du plasmide pY1-112. B) Les séquences du site promoteur de l'ARN-polymérase T7 situé en amont de l'extrémité 5' ainsi que le site de clonage 5'; Eco RI sont indiqués. En aval de l'extrémité 3', on retrouve les sites de restrictions Dra I (site de digestion utilisé pour produire l'ARN hY1, après transcription *in vitro* de l'ADNc) et le site Hind III (site de clonage 3'). Les petits caractères indiquent la séquence des oligonucléotides 5' et 3' utilisés lors du PCR, les caractères plus gros font partie de l'ADN sens correspondant à l'ARN hY1. C) Une flèche indique la position de la délétion $\Delta G13$ sur le schéma de la structure secondaire prédite de l'ARN hY1.

$\Delta G13$: délétion d'un G à la position 13
5'-TTTAAA-3': site de restriction pour l'enzyme Dra I
5'-AAGCTT-3': site de clonage 3'; Hind III
5'-TAATACGA-3: site promoteur pour l'ARN
 polymérase T7
5'-AGATTC-3': site de clonage 5'; Eco RI



B

3'GTTCGAA¹¹²TTTCTGATCAGTTCACGTC
 Hfnd III
 ATCACTCTTCCCCCCTTTCTCATCTTG
 TTCCTCAAGCTAGACATTGACTGACAC
 TTGTTAGTTAACTCTATTGAGTGATG
 ↓
 (G)_{Δ13}AAGCCTGGTCGGATATCACTCAGCATA
 T7
 ATCTTAGATGA-5'
 Eco RI

C

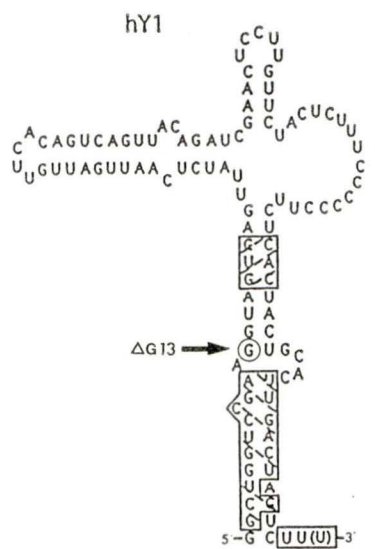


Figure 7. Séquençage de l'ADN du plasmide pY4-95

A) Les lignes 1 à 4 représentent la séquence de l'ADN (brin antisens) du plasmide pY4-95 correspondant à l'ARN hY4. Les séquences supplémentaires en 3', soit le site de restriction pour l'enzyme Dra I et le site de clonage Hind III sont démontrés. B) Les lignes 5 à 8 illustrent une partie de la séquence de l'ADN (brin sens) du plasmide pY4-95, où le site de l'ARN-polymérase T7 en amont de l'extrémité 5' de l'ADN est mis en évidence. Le site de clonage 5', soit Eco RI est aussi indiqué.

5'-AAGCTT-3': site de clonage 3'; Hind III

5'-TTTAAA-3': site de restriction pour l'enzyme Dra I

5'-CTTAAG-3': site de clonage 5'; Eco RI

5'-ATTATGCTGAG-3': site promoteur pour l'ARN
polymérase T7

A



3'GCGGTTTCGAAATTTTCGGTCAGTTTAAA
 Hind III
 TCGTCACCCCCCAACATATGGTTGAAA
 TCACTGTGATTACAATTATTCAAGACT
 ATTGGGTGATGGTAGCCTGGTCGGAT-5'

B



5'TCACTTAAGATTATGCTGAGTGATATCC
 Eco RI
 GACCAGGCTACCATCAC...-3'

négatif lors des études ultérieures des sérums anti-ARN hY5. Les mêmes plasmides seront aussi utilisés pour produire des sondes d'ARN biotinylées qui seront utilisées pour déterminer la localisation cellulaire des ARN hY. Les ARN hY transcrits *in vitro* pourront aussi être utilisés pour des études d'association avec les protéines connues Ro et La et pour identifier d'autres protéines potentiellement associées aux ARN hY à partir d'extraits cellulaires semi-purifiés.

3.5 COMPARAISON DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN Ro

L'ARN hY5 est le seul ARN Ro (hY1, hY3, hY4 et hY5) immunoprécipitable par certains sérums, ce qui nous a amenés dans un premier temps, à supposer qu'une structure propre à cet ARN puisse former l'épitope. En comparant les structures secondaires prédites par le programme FOLD (Zuker et Stiegler, 1981), nous avons pu délimiter les régions potentiellement impliquées dans la formation de l'épitope ciblé par les anti-ARN hY5. Ainsi deux régions de l'ARN hY5 semblent exclues. La première région implique l'appariement des extrémités 5' et 3' qui présente une région très homologue entre les quatre ARN Ro (Figure 1). Cette région comprend d'ailleurs le site d'attachement de la protéine Ro 60 kD (Wolin et Steitz, 1984). La deuxième région constitue la séquence de 3 ou 4 uridines présentes à l'extrémité 3' de tous les ARN Ro, qui correspond au site de liaison de la protéine La.

3.6 LES ÉPITOPES SONT CONFORMATIONNELS

Des études effectuées dans le laboratoire du Dr Boire ont démontré que l'épitope reconnu par les sérums JW et MD sur l'ARN hY5 est conformationnel et exclut la boucle située à la toute extrémité de la structure secondaire prédite pour l'ARN hY5. Ces études consistaient entre autres à immunoprécipiter deux fragments (l'un de 27 nt et l'autre de 31 nt) obtenus suite à une digestion partielle de l'ARN hY5 par la RNase T1 (Figure 2). Cette RNase clive en 3' des G simple brin. Les fragments en question sont immunoprécipités si et seulement si ils sont appariés, car la dénaturation par la chaleur de ces fragments abolit la reconnaissance par les anti-ARN hY5 face à chacun de ces fragments pris séparément. Ces résultats suggèrent fortement que la structure tridimensionnelle de l'ARN hY5 est impliquée dans la formation de l'épitope.

3.7 PRODUCTION D'ARN hY5 MUTANTS

Afin de poursuivre la caractérisation de ce nouveau type d'autoanticorps, nous avons entrepris la construction de deux vecteurs pour l'expression de deux ARN hY5 mutants. Les deux mutants; pY5-78 et pY5-84«O» sont produits par mutagenèse dirigée par PCR, à partir du plasmide pY5, comme décrit dans les sections 2.2.2. et 2.2.3 dans les Matériels et Méthodes. Le plasmide pY5-84«O» possède une substitution des nucléotides 5'-CCCAC-3' par 5'-TTTTT-3' à la position 53-57. Cette substitution élimine l'appariement des nouveaux

nucléotides 53–57 aux nucléotides 17–21 qui existe dans l'ARN hY5 intact. Cette ouverture des brins empêche la continuité de la double hélice et déstabilise complètement la structure secondaire de la partie centrale de l'ARN Y5, d'où le nom de ce mutant Y5–84«Ouvert» (Figure 8). Le plasmide mutant pY5–78 contient une délétion de 6 nucléotides consistant en la grande boucle située à droite de la structure secondaire bidimensionnelle de l'ARN hY5–84 (position 47–52) (Figure 8). L'ARN mutant de 78 nucléotides appelé Y5–78, produit à partir de pY5–78, conserve la conformation générale de l'ARN hY5–84. Le séquençage complet du plasmide pY5–78 (Figure 9) nous démontre bien la présence du site promoteur T7 nécessaire à la transcription de cet ADN ainsi que les 3 sites de restriction; Dra I (pour une digestion permettant une extrémité 3' normale), Hind III (site de clonage 3') et Xba I (site de clonage 5'). Le séquençage complet du plasmide pY5–84«O» a aussi été réalisé et ce sur les 2 brins de l'ADNc (résultats non montrés). Les Figures 10 et 11 démontrent la portion du gel de séquençage qui représente la mutation et les séquences adjacentes à celle-ci, pour les mutants pY5–78 (Figure 10) et pY5–84«O» (Figure 11A; brin antisens, Figure 11B; brin sens).

Un dernier mutant, le pY5–80 a aussi été utilisé pour l'étude de l'épitope de l'ARN hY5. Ce mutant était déjà disponible au laboratoire, et a été construit de la même façon que pour les plasmides pY5–84«O» et pY5–78. Le plasmide pY5–80 comporte une délétion de 4 nucléotides (position 58–61), qui représente

Figure 8. Schéma des différentes mutations effectuées sur l'ARN hY5

Le mutant hY5-78 correspond à la délétion de la grande boucle de 6 nucléotides encadrée (position 47-52). Le mutant hY5-80 possède la délétion de la petite boucle encadrée (position 58-61). Le mutant de substitution hY5-84"O" se voit remplacer les nucléotides 5'-CCCAC-3' encadrés par les nucléotides 5'-UUUUU-3' entourés d'une ligne pointillée (position 53-57). Les sites de restriction pour l'ADN correspondant sont indiqués, soit Hha I, Alu I et Dra I. Le site de restriction Dra I (AAATTT) est formé à l'aide de l'amorce utilisée en 3' (AAA...). Selon le site de restriction choisi sur l'ADNc correspondant, il en résultera, après transcription *in vitro*, des ARN de pleine longueur ou tronqués en 3'.

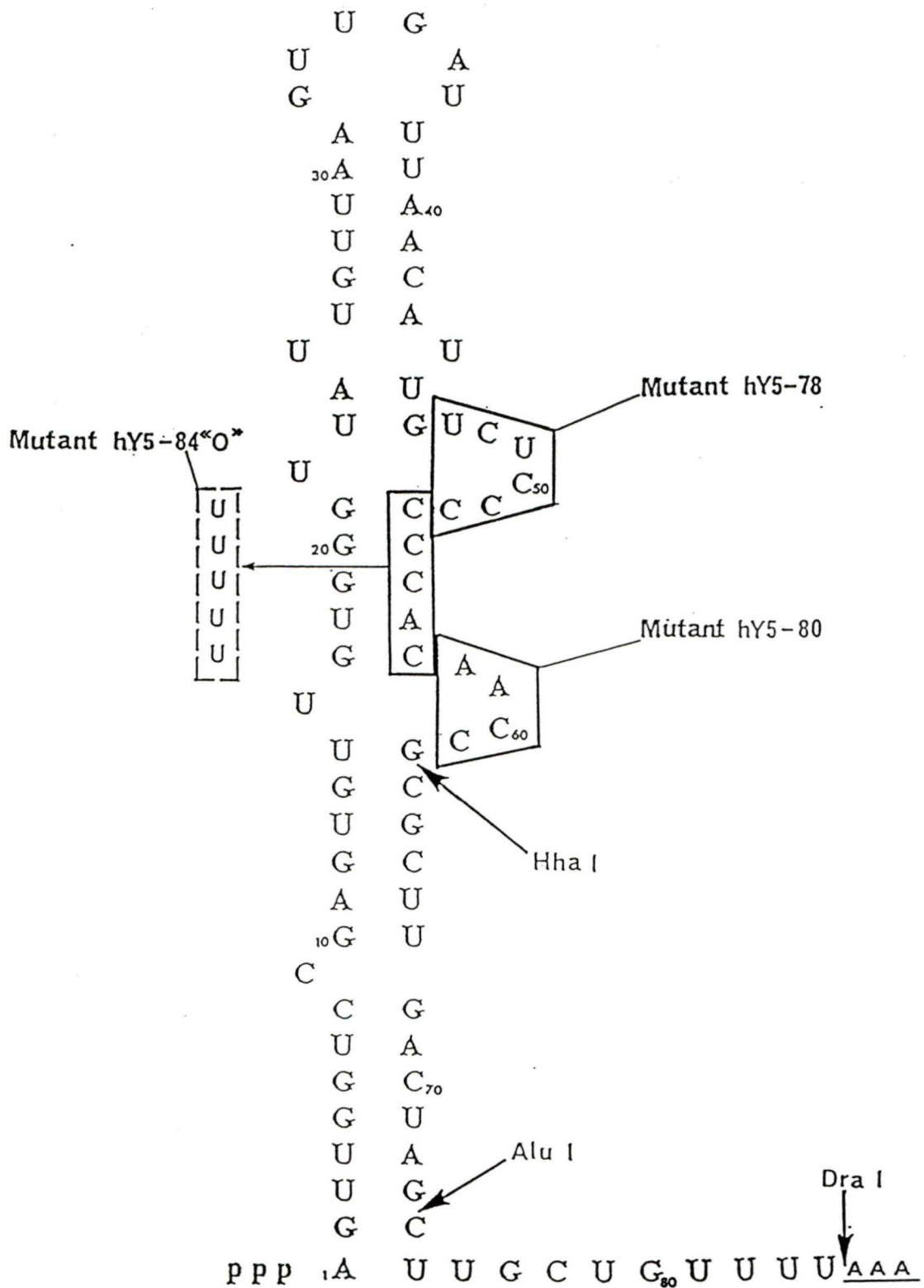


Figure 9. Séquençage complet de l'ADN du plasmide pY5-78

Les lignes 1 à 4 représentent la séquence de l'ADNc de l'ARN hY5-78 du plasmide pY5-78, bornés par les oligonucléotides utilisés lors du PCR. L'oligonucléotide de l'extrémité 3' contient le site de clonage Hind III ainsi que le site de restriction pour l'enzyme Dra I (nucléotides encadrés). L'oligonucléotide 5' contient le site promoteur pour l'ARN-polymérase T7 et le site de clonage 5'; Xba I. La flèche indique la position de la délétion de 6 nucléotides de l'ADNc du plasmide mutant; pY5-78 comparativement à l'ADNc correspondant à l'ARN Y5.

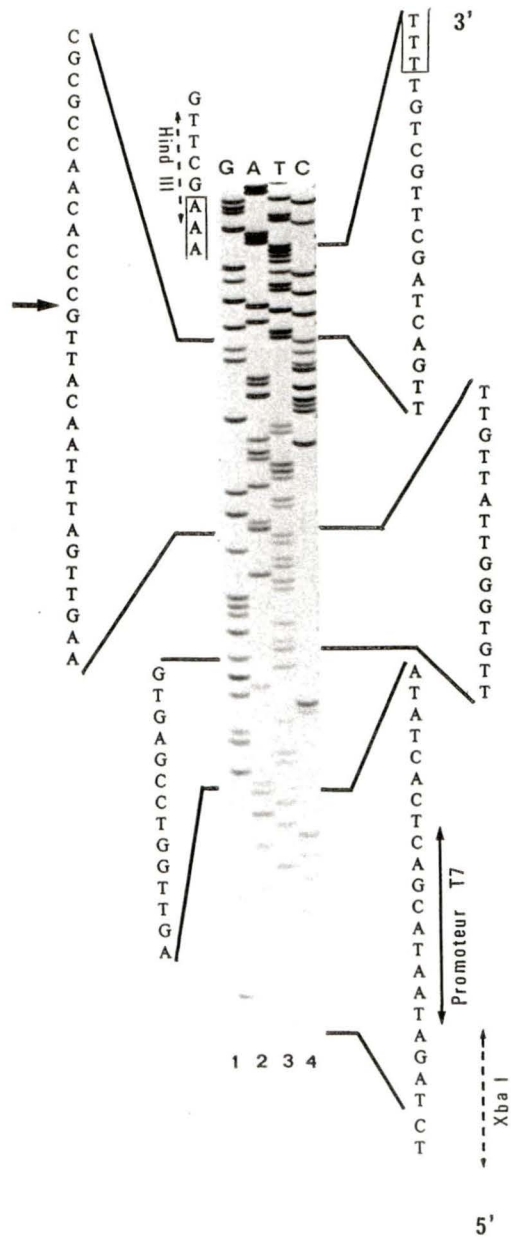


Figure 10. Séquençage du plasmide pY5-78; région mutée

Représentation de la séquence de l'ADN (brin sens) de l'ARN hY5-78. Le plasmide pY5-78 correspond à un mutant de délétion du plasmide pY5-84. La portion du gel représente les séquences adjacentes au site de la délétion et les nucléotides délétés sont encadrés. Les échantillons sont marqués au ^{35}S .

➡: position de la délétion

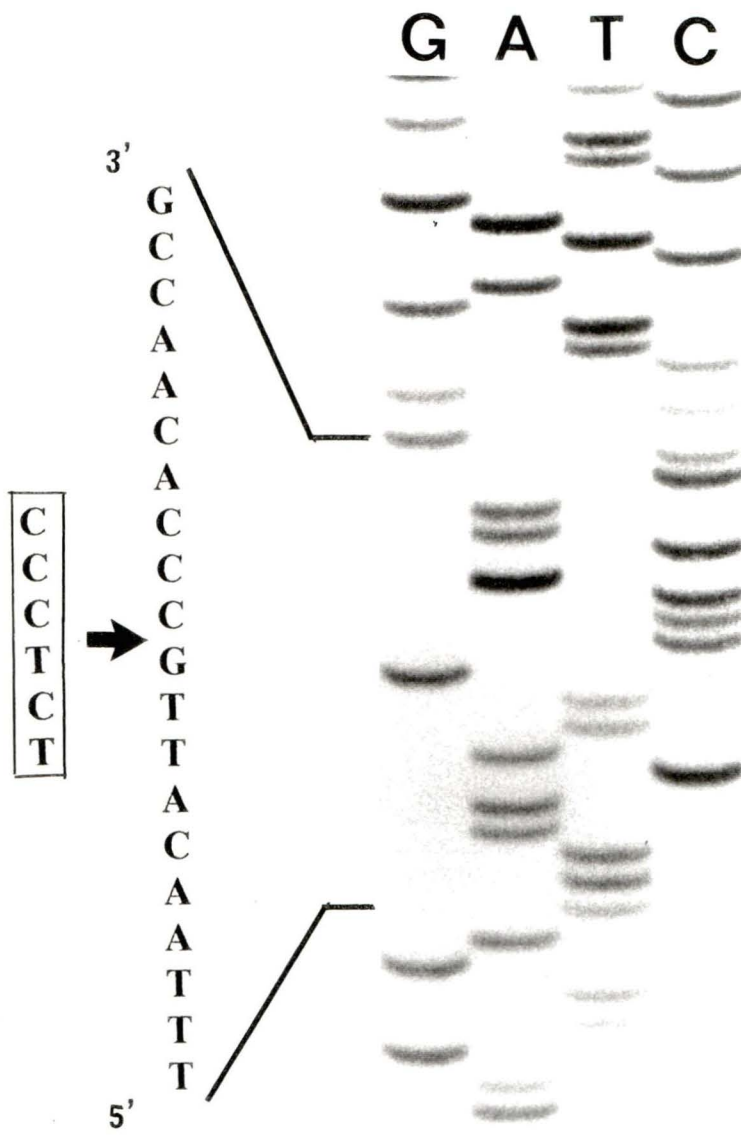
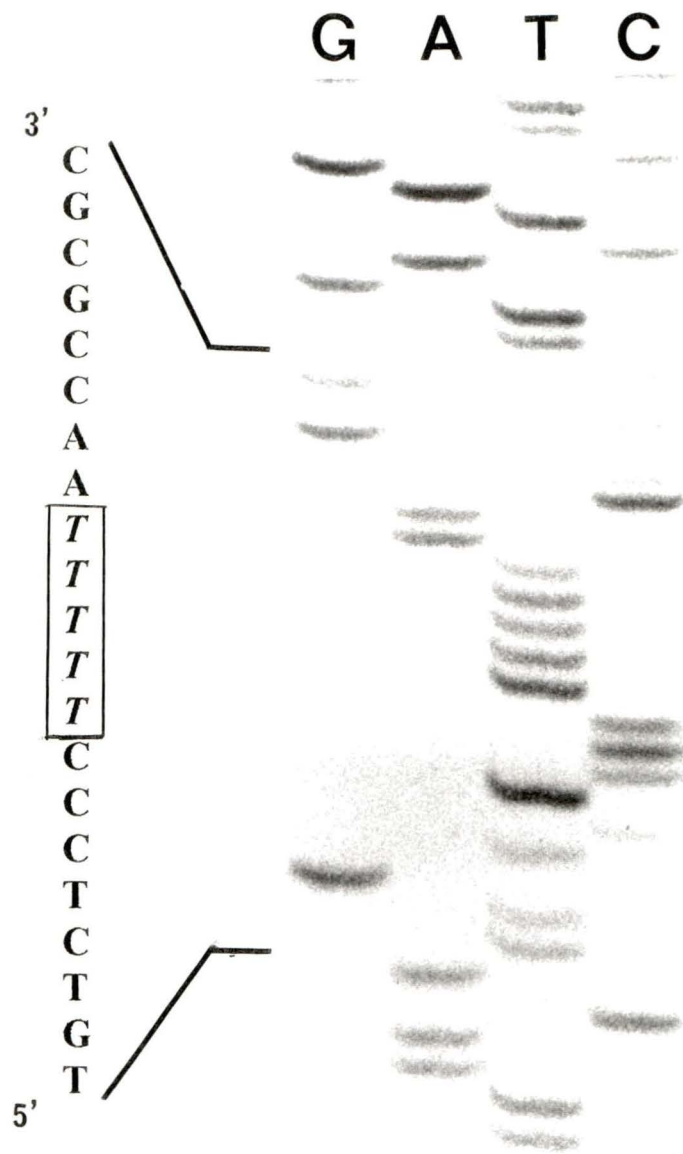


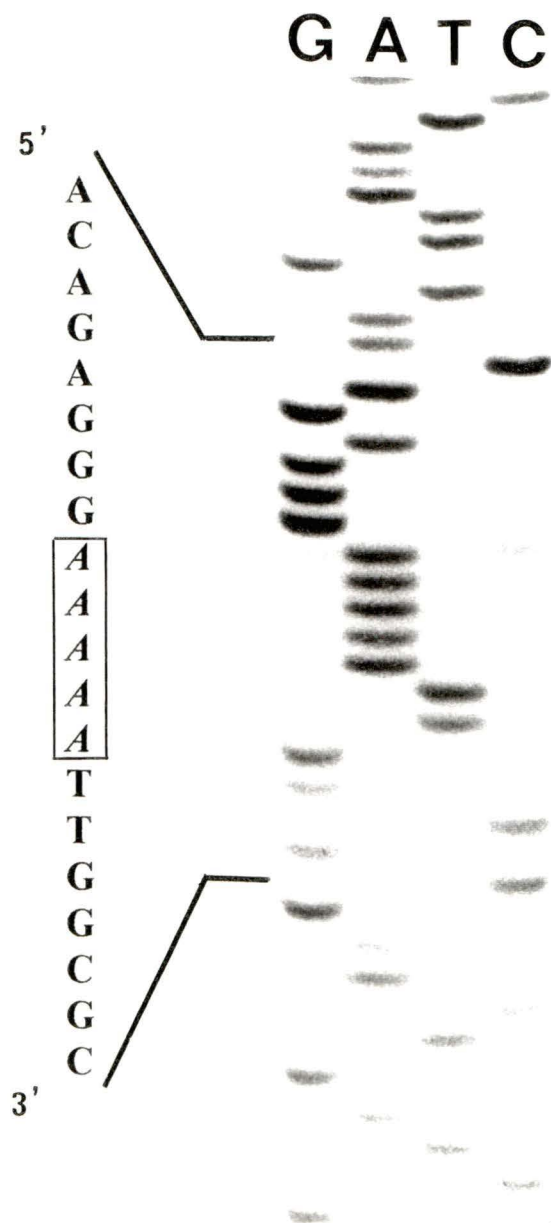
Figure 11. Séquençage du plasmide pY5-84"O"; région mutée

Les figures A représentent les séquences de l'ADN de l'ARN hY5-84"O" : A1) brin antisens et A2) brin sens. Le plasmide pY5-84"O" correspond à un mutant de substitution du plasmide pY5-84. La portion du gel représente les séquences adjacentes au site de la substitution et les nucléotides substituants sont encadrés. Les échantillons sont marqués au ^{35}S .

A1



A2



en fait la petite boucle située à droite de la structure secondaire bidimensionnelle de l'ARN hY5-84 (Figure 8). Les mutants hY5-78 et hY5-80 ont été choisis parce que leur modification par rapport à l'ARN hY5-84 n'entraîne pas de changement majeur de la structure secondaire prédite et parce que les régions protubérantes des ARN sont souvent reconnues par des protéines (Kenan et al., 1991).

Les quatre ADNc correspondants aux mutants pY5-84«O», pY5-78, pY5-80 et pY5-84 (hY5 intact) clonés dans le vecteur pUC19 peuvent subir différentes digestions enzymatiques de façon à produire des ARN hY5 *in vitro* soit intacts soit tronqués en 3' (Figure 3A). En effet, une digestion par l'enzyme Dra I de l'ADNc de Y5-84 (plasmide Y5 intact) donnera après transcription *in vitro* un ARN hY5 complet et intact de 84 nucléotides, tandis qu'une digestion par les enzymes Alu I ou Hha I produira après transcription *in vitro* des ARN hY5 tronqués en 3' soit; hY5-84/Alu I de 73 nt et hY5-84/Hha I de 62 nt. (Figures 3A et 8). Comme les sites de restrictions pour les enzymes Dra I, Alu I et Hha I sont présents sur les 4 ADNc, il en résultera 12 ARN hY5 différents; 1 ARN hY5 normal et 11 ARN hY5 mutants. Connaissant la séquence de ces ARN, nous avons utilisé le programme MULFOLD (Zuker et Jaeger, 1989) pour obtenir les structures secondaires prédites, basées sur le minimum d'énergie libre (Figure 12). En guise de comparaison, les deux structures prédites comme étant

les plus stables pour l'ARN hY5 sont aussi représentées. Étant donné leur énergie très rapprochée, les 2 structures peuvent coexister en solution.

3.8 DÉTERMINATION DES ÉPITOPES DE L'ARN hY5

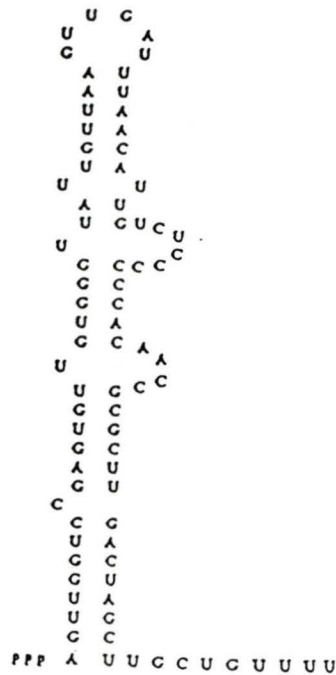
Pour s'assurer que les résultats obtenus en gel de rétention étaient réels et non un artéfact technique, nous avons testé en IPP les sérums qui retardaient l'ARN hY5 en gel de rétention (Figure 13). Pour une question de facilité et d'espace, les prochains résultats concernant la détermination de l'épitope, seront montrés seulement avec 2 sérums, soit les sérums JW et MCD. Fait surprenant, le sérum JW immunoprécipite bien l'ARN hY5-84, mais le sérum MCD l'immunoprécipite faiblement alors que tous 2 sont positifs en gel de rétention. La raison n'en était pas claire mais ces résultats suggéraient qu'il pouvait exister 2 populations d'autoanticorps anti-ARN hY5 différentes.

Dans le but de comprendre pourquoi le sérum MCD n'immunoprécipite pas l'ARN hY5, nous avons repris l'IPP cette fois-ci sur billes de protéine G (Figure 14). Les billes de protéine A ont une affinité avec les immunoglobulines de type IgG₁, IgG₂ et IgG₄ tandis que les billes de protéine G possèdent une affinité pour les immunoglobulines IgG₁, IgG₂, IgG₃ et IgG₄ (Harlow et Lane, 1988). Les résultats montrent que le sérum JW immunoprécipite autant l'ARN hY5 peu importe les billes utilisées; protéine A ou protéine G. Le sérum MCD,

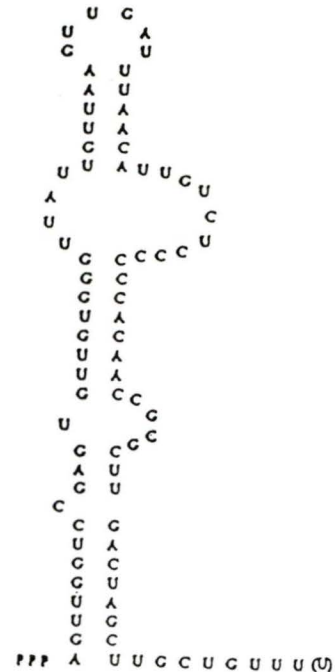
Figure 12. Structure secondaire prédite pour les ARN mutants

Pour évaluer la structure secondaire la plus probable adoptée par chaque ARN Ro mutant, les séquences des ARN hY5-80, hY5-78 et hY5-84"O" ont été traitées par ordinateur à l'aide du programme MULFOLD version 2.0 (Zuker et Jeager, 1989; Freiser et al., 1986). L'énergie libre générée pour chaque structure donnée est indiquée. En guise de comparaison, les 2 structures prédites comme étant les plus stables pour l'ARN hY5 sont aussi représentées; hY5-84 (Kato et al., 1982) et hY5-84/2 (Gelder et al., 1994).

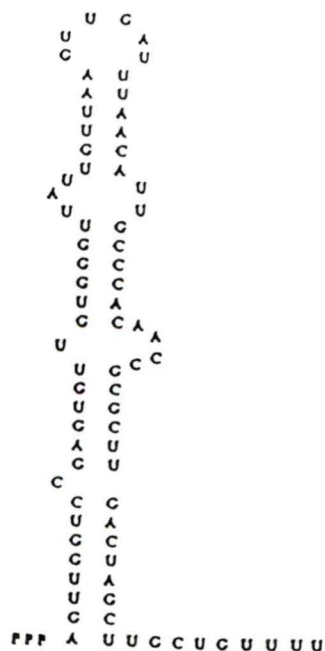
Prédiction des structures secondaires optimales (Programme MulFold : Zuker et Jaeger)



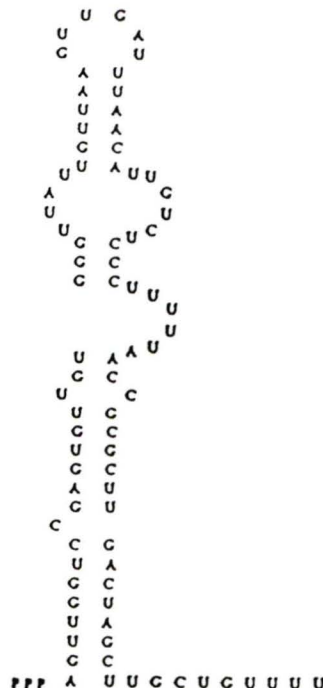
hY5-84
-23.9 kcal/mol



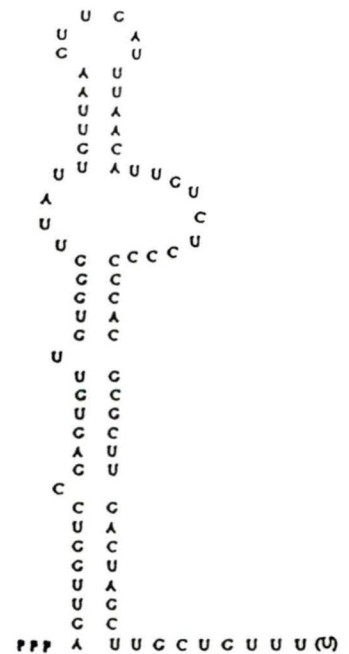
hY5-84/2
-21.2 kcal/mol



hY5-78
-24.6 kcal/mol



hY5-84''O''
-14.3 kcal/mol



hY5-80
-20.5 kcal/mol

Figure 13. Première évidence de l'existence de 2 populations de sérums différents produisant des anti-ARN hY5.

Immunoprécipitation sur billes de protéines A de l'ARN hY5-84 transcrit *in vitro* à l'aide de 3 sérums : JW (piste 1), MCD (piste 2), et un sérum normal (piste 3). Les surnageants correspondants sont démontrés respectivement dans les pistes 4, 5 et 6. Les sérums JW et MCD sont positifs pour l'ARN hY5 sur gel de rétention.

IPP-protéine A
hY5-84

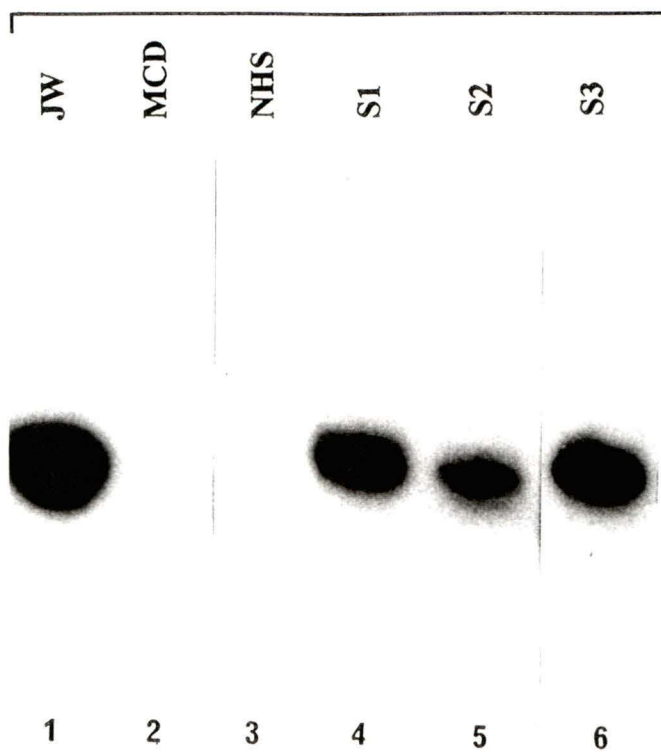


Figure 14. Comparaison billes de protéine A versus billes de protéine G, en immunoprécipitation

Immunoprécipitation de l'ARN hY5-84 transcrit *in vitro*, en utilisant des billes de protéine G versus des billes de protéine A. Pistes 1 et 2; surnageant (S) et immunoprécipitation (IPP) du sérum JW sur billes de protéines A. Pistes 4, 6, et 8; immunoprécipitation à l'aide respectivement des sérums humains JW, MCD et sérum normal (NHS) sur billes de protéine G. Les surnageants correspondants sont aussi montrés en guise de comparaison de la quantité d'ARN utilisée pour chaque immunoprécipitation; pistes 3, 5 et 7.

IPP-protéine A

IPP-protéine G

hY5-84

S-JW

IPP-JW

S-JW

IPP-JW

S-MCD

IPP-MCD

S-NHS

IPP-NHS

1

2

3

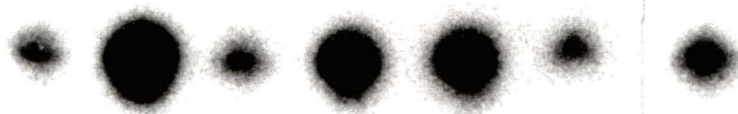
4

5

6

7

8



quant à lui, immunoprécipite l'ARN hY5 seulement lorsqu'on utilise les billes de protéine G (Figures 13 et 14). L'explication la plus vraisemblable est que les autoanticorps anti-ARN hY5 du sérum MCD sont de façon prédominante de type IgG₃ et ceux du sérum JW appartiendraient à toutes les sous-classes d'IgG. Les prochains résultats d'IPP pour le sérum MCD seront donc réalisés sur billes de protéine G.

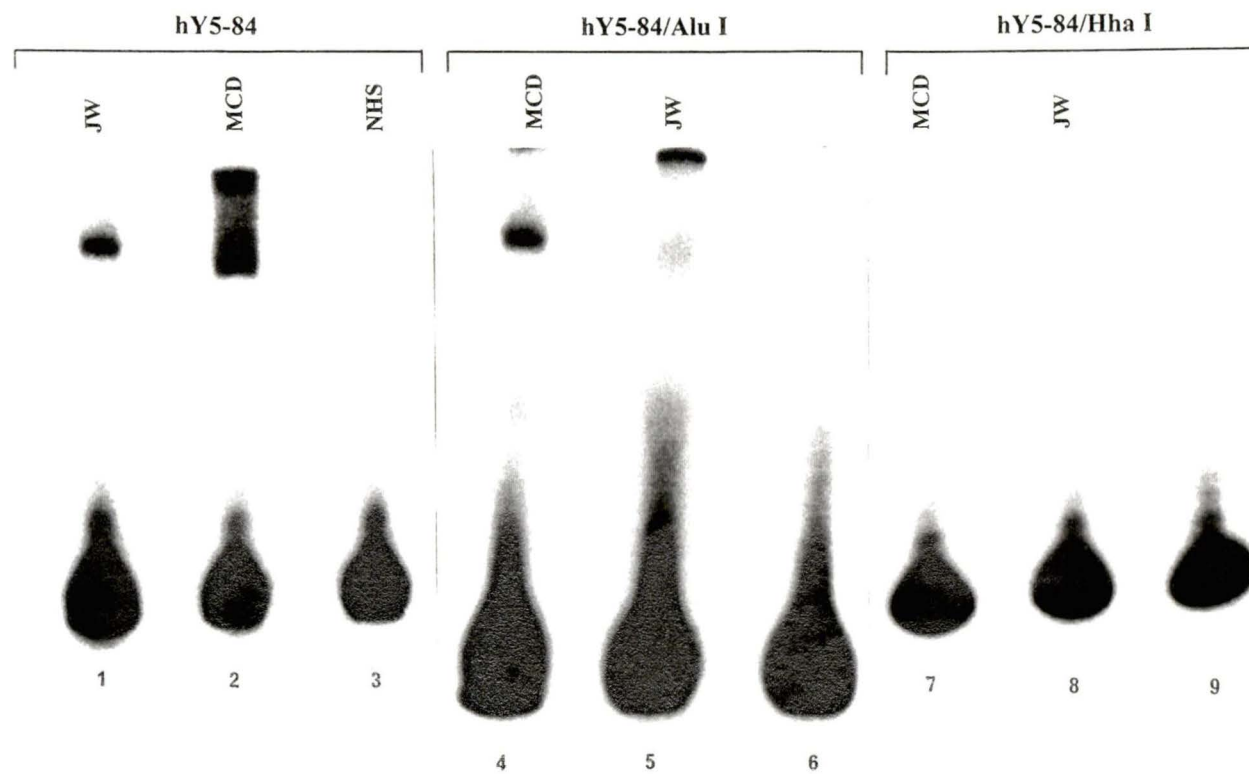
Afin de mieux définir le ou les épitopes ciblés sur l'ARN hY5, nous avons testé les sérums hY5 positifs vis-à-vis les différents ARN hY5 mutants. La Figure 15 confirme l'hypothèse de l'existence d'au moins 2 épitopes sur l'ARN hY5. En effet, les sérums JW et MCD reconnaissent tous deux l'ARN hY5-84 intact (Figure 15A, pistes 1 et 2). Mais lorsque cet ARN est tronqué en 3' pour donner l'ARN hY5-84/Alu I, la reconnaissance du sérum JW est presque abolie, alors que celle du sérum MCD demeure entière (Figure 15A, pistes 4 et 5). Pour perdre la reconnaissance du sérum MCD, il faut tronquer davantage en 3' l'ARN hY5, soit l'ARN hY5-84/Hha I (Figure 15A, piste 7). Ce résultat suggère fortement que les autoanticorps des sérums JW et MCD ne sont pas dirigés contre le même épitope sur l'ARN hY5. Pour confirmer cette hypothèse la Figure 15B nous dévoile que le mutant hY5-78 est reconnu aussi bien par les 2 sérums JW et MCD (pistes 1 et 2), alors que les mutants hY5-84«O» et hY5-80 sont reconnus seulement par le sérum JW (pistes 4-7). Pour perdre la reconnaissance du sérum JW, il faut que les ARN mutants hY5-84«O» et hY5-

Figure 15. Mise en évidence des 2 épitopes de l'ARN hY5.

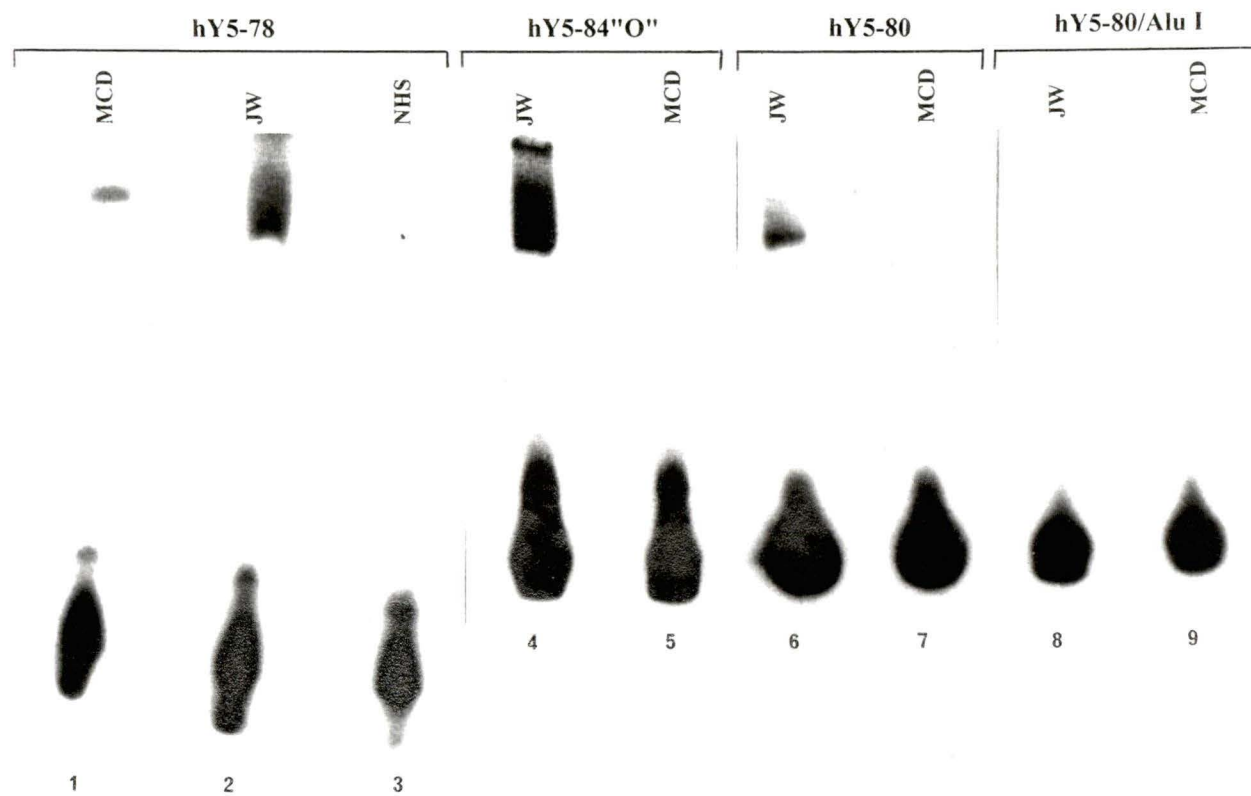
A) Gel de rétention des ARN hY transcrits *in vitro* par les sérums JW, MCD et NHS. Les pistes 1 à 3 correspondent à l'ARN hY5-84 comme source d'antigène, en présence des sérums JW (piste 1), MCD (piste 2) et d'un sérum normal (NHS, piste 3). Les pistes 4 à 6 correspondent à l'antigène hY5-84 / Alu I en absence (piste 6) ou en présence des sérums suivants : MCD (piste 4) et JW (piste 5). Les pistes 7-9 utilisent la source d'antigène hY5-84 / Hha I en absence (piste 9) ou en présence de sérum MCD (piste 7) et JW (piste 8).

B) Les pistes 1 à 3 utilisent comme antigène l'ARN mutant hY5-78 en présence de sérums : MCD (piste 1), JW (piste 2) et d'un sérum témoin (NHS, piste 3). Les pistes 4 à 9 quant à elles représentent les ARN suivants : hY5-84"O" (pistes 4 et 5), hY5-80 (pistes 6 et 7) et hY5-80 / Alu I (pistes 8 et 9). Les pistes paires 4, 6 et 8 correspondent au sérum JW et les pistes impaires 5, 7 et 9, au sérum MCD.

15 A



15 B



80 soient tronqués en 3' pour donner les ARN hY5-84«O»/Alu I (résultats non montrés) et hY5-80/Alu I (Figure 15B, piste 8). Ces résultats confirment bien l'existence d'au moins 2 épitopes sur l'ARN hY5.

Les Figures 16 et 17 confirment la corrélation entre les 2 techniques; IPP et gel de rétention. La Figure 16 montre que le sérum JW reconnaît les ARN hY5 qui possèdent leur extrémité 3' naturelle, soit hY5-84«O» (piste 2), hY5-78 (piste 3), hY5-84 (piste 7) et hY5-80 (non-montré) en IPP sur billes de protéine A. Les ARN hY5 tronqués en 3' sont très faiblement reconnus (pistes 4-6). La Figure 17 correspond à une IPP sur billes de protéine G avec le sérum MCD. les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par gel de rétention, i.e. les ARN hY5-84 (piste 2) et hY5-78 (piste 4) sont reconnus tandis que le mutant hY5-84«O» ne l'est pas.

3.9 LOCALISATION DES ÉPITOPES SUR L'ARN hY5

L'ensemble des résultats obtenus nous amène à proposer qu'il existe au moins deux populations d'anti-ARN hY5 reconnaissant 2 épitopes conformationnels distincts. La partie supérieure de la molécule ainsi que les séquences conservées entre les ARN Ro seraient exclues de ces épitopes. L'épitope A reconnu par le sérum JW semble nécessiter les nucléotides 5'-CUUG-3' (position 74-77). En effet cette séquence demeure présente chez les fragments obtenus et encore reconnus par les autoanticorps, suite à la digestion

**Figure 16. Corrélation entre le gel de rétention et
l'immunoprécipitation pour le sérum JW**

Immunoprécipitation des différents ARN hY par les sérums JW et un sérum normal (NHS), sur billes de protéine A. Des quantités équimolaires de chaque ARN transcrit *in vitro* sont utilisé lors de l'immunoprécipitation. Piste 1; surnageant de l'ARN hY1, pistes 2 à 8 reconnaissance de différents ARN par le sérum JW, pistes 9 à 10; le sérum témoin (NHS).

IPP-protéine A

JW

NHS

S-hY1

hY5-84"O

hY5-78

hY5-84/BsmAI

hY5-84/Hha I

hY5-84/Alu I

hY5-84

hY1

hY5

hY1

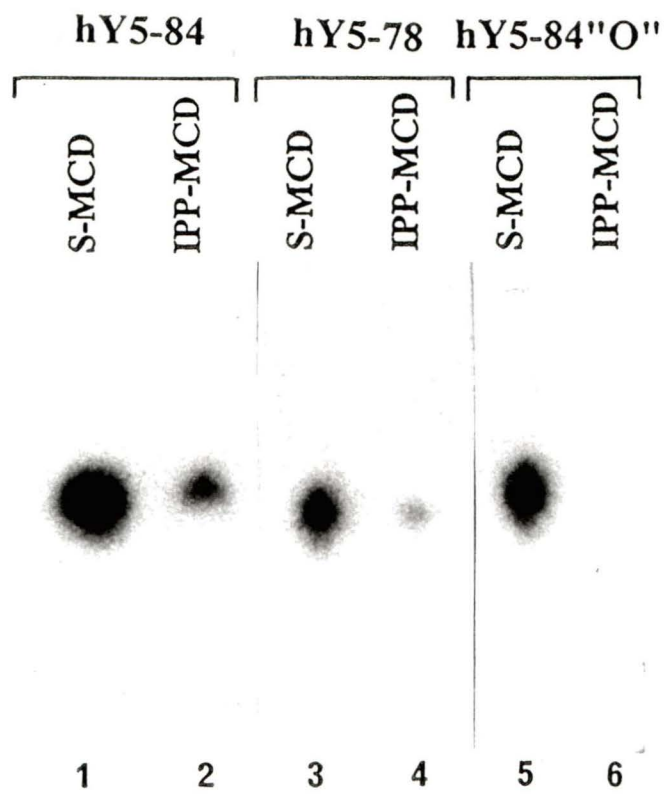
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10



**Figure 17. Corrélation entre le gel de rétention et
l'immunoprécipitation pour le sérum MCD**

Immunoprécipitation de l'ARN hY5-84, hY5-78 et hY5-84"O", par le sérum MCD; pistes 2, 4 et 6 respectivement. Les pistes 1, 3 et 5 démontrent le surnageant correspondant à chaque immunoprécipitation.

IPP-protéine G





partielle de l'ARN hY5 à la RNase T1 (Figure 2). Cette même séquence est perdue dans l'ARN hY5/Alu I qui lui n'est pas reconnu par le sérum JW. Cette séquence n'est pas retrouvée chez les autres ARN Ro, qui eux ne sont pas reconnus (Figure 1). L'épitope B ciblé par les autoanticorps du sérum MCD comprendrait la boucle de 4 nucléotides 5'-AACC-3' (position 58-61) absente chez le mutant hY5-80 et de conformation modifiée chez les mutants non reconnus; hY5-84«O» et hY5-84/Hha I. L'absence de reconnaissance du mutant hY5-84/Hha I (qui contient les nucléotides 58-61) pourrait s'expliquer par un appariement des nucléotides de la boucle avec les nucléotides du brin 5' lorsque l'ARN est tronqué au site Hha I (Figure 8). Ainsi les nucléotides perdraient leur structure «boucle» et la nouvelle conformation adoptée détruirait l'épitope. De plus la structure «boucle» entre 2 régions appariées est aussi perdue chez le mutant hY5-84«O» (Figure 12). La Figure 18 localise la position suggérée des 2 épitopes.

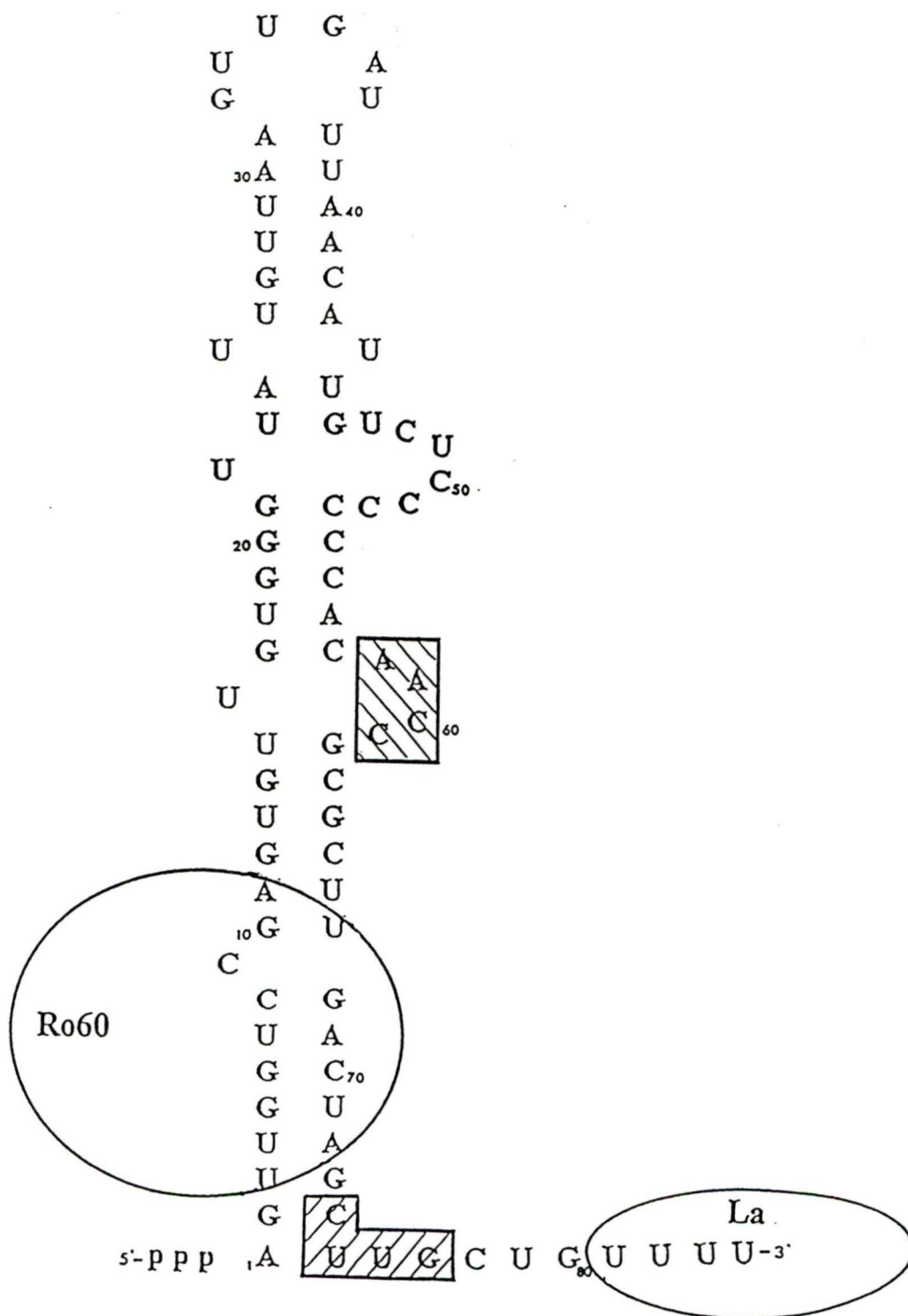
3.10 NON-RECONNAISSANCE D'UN OLIGONUCLÉOTIDE ADN CORRESPONDANT À L'EXTRÉMITÉ 3' DE L'ARN hY5

Nous ignorons si les autoanticorps anti-hY5 sont spécifiques à l'ARN ou s'ils pourraient reconnaître l'ADN correspondant. De plus, aucune étude du genre concernant les anti-ARN n'a été rapportée dans la littérature. Or, suite aux résultats préliminaires obtenus concernant l'épitope ciblé par le sérum JW, soit une portion de l'extrémité 3' de l'ARN hY5, nous avons testé un

**Figure 18. Schéma des deux épitopes de l'ARN hY5
reconnus par les autoanticorps**

Localisation des 2 épitopes reconnus sur l'ARN hY5; l'épitope A qui comprend les 4 nucléotides 5'-CUUG-3' de la position 74-77 (extrémité 3') et l'épitope B qui comprend les nucléotides (5'-AACC-3') de la boucle 58-61. Le sérum JW reconnaît le premier épitope tandis que le sérum MCD cible l'épitope B. Les protéines Ro 60 kD et La liées à l'ARN sont représentées par des cercles.

: région nécessaire pour l'expression de l'épitope A
: région nécessaire pour l'expression de l'épitope B



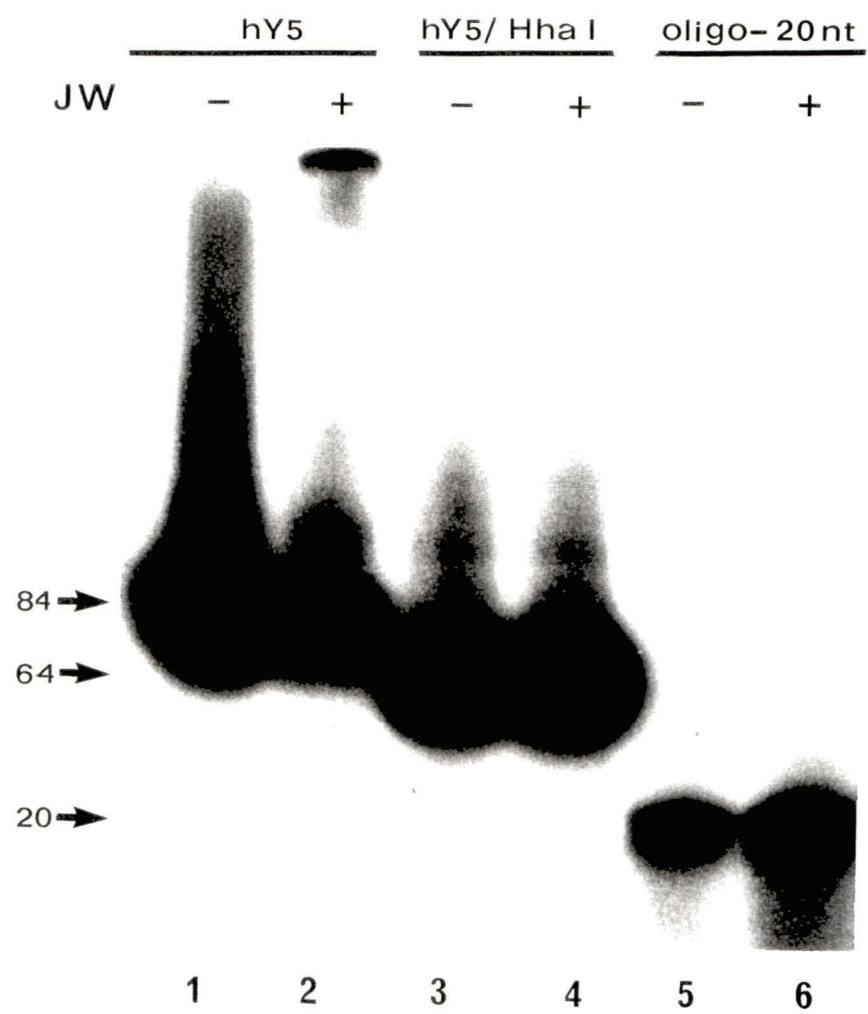
oligonucléotide d'ADN comportant la région porteuse de l'épitope. L'oligonucléotide correspond en fait aux 20 derniers nucléotides de l'ARN hY5 (position 64–84). Celui-ci est marqué avec ^{32}P en 5' par la T4 polynucléotide kinase et testé en gel de rétention. La Figure 19 illustre que l'oligo d'ADN simple brin n'est pas reconnu par le sérum JW (piste 6). Ceci ne prouve pas définitivement que l'ADN n'est pas reconnu par les anti-ARN hY5, étant donné que ce court oligonucléotide peut ne pas adopter la conformation tridimensionnelle qui existe réellement chez l'ARN hY5 total. Ainsi pour obtenir une réponse fidèle à notre question, il faudrait utiliser un oligonucléotide d'ADN sens simple brin de pleine longueur (84 nt) qui adopterait vraisemblablement une structure secondaire très semblable à celle de l'ARN (Paquette et al., 1990).

3.11 PURIFICATION DES ANTI-ARN hY5

Nous nous sommes intéressés à savoir si les anti-ARN hY5 reconnaîtraient toujours l'ARN lorsque celui-ci est lié aux protéines Ro60 et La. Pour répondre à cette question, il s'agissait d'isoler spécifiquement les anti-ARN hY5 et de les tester vis-à-vis la RNP Ro^{hY5} en gel de rétention. Ce résultat nous renseignerait sur deux points 1) si la conformation des épitopes sur l'ARN hY5 (nécessaire à la reconnaissance) est conservée lorsque les protéines sont

Figure 19. Non-reconnaissance d'un oligonucléotide d'ADN correspondant à l'extrémité 3' de l'ARN hY5

Gel de rétention montrant l'ARN hY5 seul (piste 1), et en présence du sérum JW (piste 2). Les pistes 3 et 4 correspondent respectivement à l'ARN hY5/Hha I seul et en présence du sérum JW. Ces résultats rappellent l'importance de l'extrémité 3' pour la reconnaissance de l'ARN hY5 par le sérum JW. Les pistes 5 et 6 utilisent comme source d'antigène un fragment d'ADN de 20 nucléotides qui correspond à l'extrémité 3' de l'ADN de hY5 (position 64–84) seul (piste 5), et en présence du sérum JW. La longueur de chaque antigène est indiquée en nombre de nucléotides.



présentes 2) si les anti-ARN hY5 sont une sous-espèce des anti-RNP Ro^{hY5} ou s'il s'agit de deux populations différentes d'anticorps.

3.11.1 Production de l'ARN hY5-biotinylé

Un essai d'affinité en suspension a été mis au point afin de tenter d'isoler spécifiquement les anti-ARN hY5, à partir des IgG totaux du sérum JW. L'affinité de notre «mini-colonne» est basée sur la forte interaction qui existe entre la biotine et la streptavidine. En effet, le principe était de produire de l'ARN hY5 *in vitro*, biotinylé et/ou radiomarqué (Matériels et Méthodes, section 2.11). Une fois la transcription terminée, un essai simplifié de «dot-blot» est utilisé pour confirmer la présence de biotine dans l'ARN. L'ARN-biotinylé ainsi que l'UTP-biotinylé (contrôle positif) donnaient bien la coloration mauve attendue contrairement à l'ARN hY5 non-biotinylé (résultats non montrés).

3.11.2 Reconnaissance de l'ARN hY5-biotinylé

Par la suite, nous devons déterminer la quantité de biotine que l'ARN devait contenir. Celle-ci devait être suffisante pour permettre à l'ARN de se lier à la streptavidine et ce, sans réduire l'immunogénécité de l'ARN face aux autoanticorps. Nous avons donc choisi deux rapports différents de UTP-biotinylé/UTP, de 1/10 et de 4/25. L'ARN hY5 comporte 32 uridines sur 84 nucléotides (38%), il en résultera respectivement environ 3 et 5 UTP-biotinylé, distribués au hasard, par molécule d'ARN hY5. L'ARN hY5-biotinylé et

radiomarqué a donc été testé en gel de rétention et en IPP avec le sérum complet JW et les IgG isolés du sérum JW. Les résultats montrent que la biotine ne réduit pas la reconnaissance des anti-ARN hY5 face à cet ARN légèrement modifié, et ce pour les 2 quantités d'UTP-biotinylé utilisées (Figure 20, pistes 5 et 7).

3.11.3 Interaction biotine-streptavidine

Finalemt, les 2 échantillons d'ARN hY5-biotinylé 1/10 et 4/25 sont mis en présence de 100 µl de billes d'agarose-streptavidine, pour une incubation de 1 heure à température ambiante. Les billes sont ensuite lavées plusieurs fois avec le tampon IPP. La quantité de radioactivité présente dans les culots (billes) et dans les surnageants est mesurée après chaque lavage. Le Tableau 2 montre que les ARN hY5-biotinylés 1/10 et 4/25 demeurent liés à 90% à la streptavidine et ce, même après 5 lavages (colonnes 3 et 4). La perte est probablement causée par le rejet de quelques billes dans le surnageant, car ici une saturation de la streptavidine semble peu réaliste étant donné son utilisation en excès. En effet, selon le fabricant, 100 µl de billes agarose-streptavidine lient 1.7 µg de biotine (ce qui dépasse largement la quantité utilisée), en se basant sur le fait que 1 mole de streptavidine lie 4 moles de biotine. Au contraire, les ARN hY5 non-biotinylés (colonnes 1 et 2) sont perdus à environ 70% après le premier lavage et d'au moins 90% suite au deuxième

Figure 20. Contrôles pour la mise au point de l'essai d'affinité en suspension

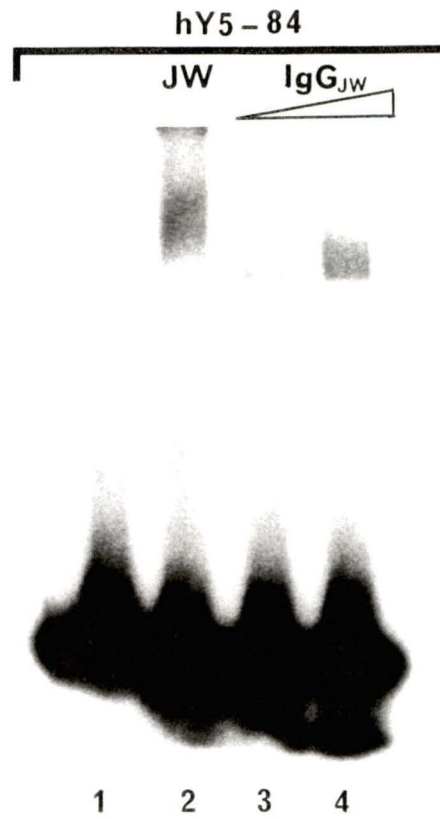
A) Les IgG totales du sérum JW sont isolées sur capsule de protéine A. La fraction récupérée est testée en gel de rétention pour vérifier qu'elle contient toujours les anticorps anti-hY5-spécifiques avant de poursuivre la purification de ceux-ci par l'essai d'affinité en suspension. Piste 1; l'ARN hY5-84 seul, piste 2; sérum JW, pistes 3 et 4; quantité croissante d'IgG totales (isolées sur protéine A) du sérum JW, soit respectivement de 35 et de 70 µg.

B) Reconnaissance de l'ARN hY5-biotinylé par le sérum JW et par ses IgG totales en immunoprécipitation sur protéine A. Pistes 1 et 2; hY5-84 non biotinylé, pistes 3 et 4; hY5-84 biotinylé rapport d'UTP-biotinylé/UTP de 1/10, pistes 5 et 6; hY5-84 biotinylé rapport d'UTP-biotinylé/UTP de 4/25. Les pistes 1, 3 et 5 contiennent le sérum JW comme source d'anticorps tandis que les IgG totales du sérum JW sont utilisées pour les pistes 2, 4 et 6. Les pistes 7 et 8 sont des contrôles négatifs où un sérum normal est utilisé face à l'ARN hY5-84 non biotinylé (piste 7) et face à l'ARN hY5-84 biotinylé 1/10 (piste 8). Les surnageants des immunoprécipitations des pistes 7 et 8 sont montrés respectivement dans les pistes 9 et 10.

biotinylé + : rapport d'UTP biotinylé/UTP de 1/10

biotinylé + : rapport d'UTP biotinylé/UTP de 4/25

A



B

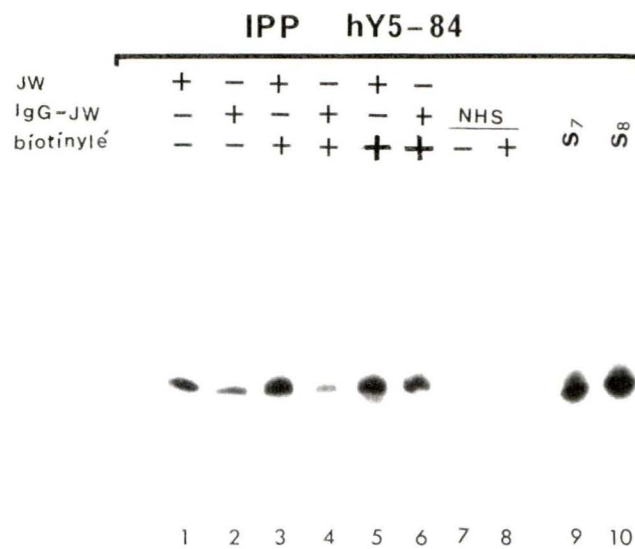


Tableau 2. Résultats de la mise au point de l'essai d'affinité en suspension; localisation radioactive de l'ARN hY5

Chaque tube contient 100 µl de billes agarose-streptavidine auxquelles on a ajouté une quantité égale d'ARN radiomarqué dans un volume final de 300 µl de Net-2. Tous les lavages sont faits dans un premier temps avec 500 µl de la solution d'IPP et dans un deuxième temps par une solution de 0.15 M glycine pH 2.3. Le tube 1 ARN hY5 marqué a été préparé en parallèle au tube 3 ARN hY5-biotinylé marqué dont le rapport UTP-biotinylé/UTP est de 1/10. Le tube 2 a été préparé en parallèle au tube 4; l'ARN y est biotinylé dans un rapport 4/25. Les tubes 1 et 3 présentent un rapport de CTP chaud/CTP froid de 1/1500 et les tubes 2 et 4 de 1/2500. Les comptes initiaux (cpm) sont de valeurs inférieures que les comptes enregistrés pour le culot (billes) après le premier lavage étant donné qu'ils ont été pris en présence du tampon Net-2 qui produit un effet de "quenching". Les résultats représentent la quantité de radioactivité de chaque culot et de chaque surnageant (résultats entre parenthèses) mesurée après chaque lavage:

Tableau 2. Résultats de la mise au point de l'essai d'affinité en suspension; biotine-streptavidine.
(Localisation radioactive de l'ARN hY5 biotinylé)

tubes	1 hY5 marqué (1:1500)	2 hY5 marqué (1:2500)	3 hY5 biotinylé (1:10) marqué (1:1500)	4 hY5 biotinylé (4:25) marqué (1:2500)
comptes initiaux (cpm)	3621	2329	2909	2668
lavages	cpm enregistrés pour le culot (cpm enregistrés pour le surnageant)			
1	1196 (1673)	1135 (1574)	6107 (1080)	6556 (2034)
2	222 (160)	270 (261)	5872 (112)	6419 (109)
3	120 (50)	73 (50)	5806 (619)	5946 (19)
4	63 (11)	78 (11)	5519 (141)	5953 (164)
5	58 (23)	26 (0)	5416 (63)	5744 (430)
élution à la glycine	cpm enregistrés pour le culot (cpm enregistrés pour le surnageant)			
1	- (-)	- (-)	5664 (56)	5865 (20)
2	- (-)	- (-)	5879 (12)	5563 (100)
3	- (-)	- (-)	5714 (18)	5598 (41)

lavage, démontrant que la présence de biotine est nécessaire pour l'adsorption de l'ARN aux billes.

Trois lavages sont enfin effectués avec le tampon 0.15 M glycine pH 2.3. Cette étape permet de vérifier si le lien biotine-streptavidine est conservé à ce pH, étant donné que c'est cette même solution qui servira ultérieurement à éluer les autoanticorps liés à l'ARN hY5-biotinylé. Les résultats démontrent que les ARN hY5-biotinylés ne sont pas élués dans ces conditions, ainsi il sera possible de réutiliser la «mini-colonne» en la conservant dans la solution NET-2, à -80°C. Selon la littérature, une solution 6 M guanidine-HCl pH 2.5 est capable de briser le lien biotine/streptavidine (Ausubel et al., 1992). La solution NET-2 contenant 0.85% SDS, 300 mM d'acétate de sodium en fait autant (résultat non-mostraré).

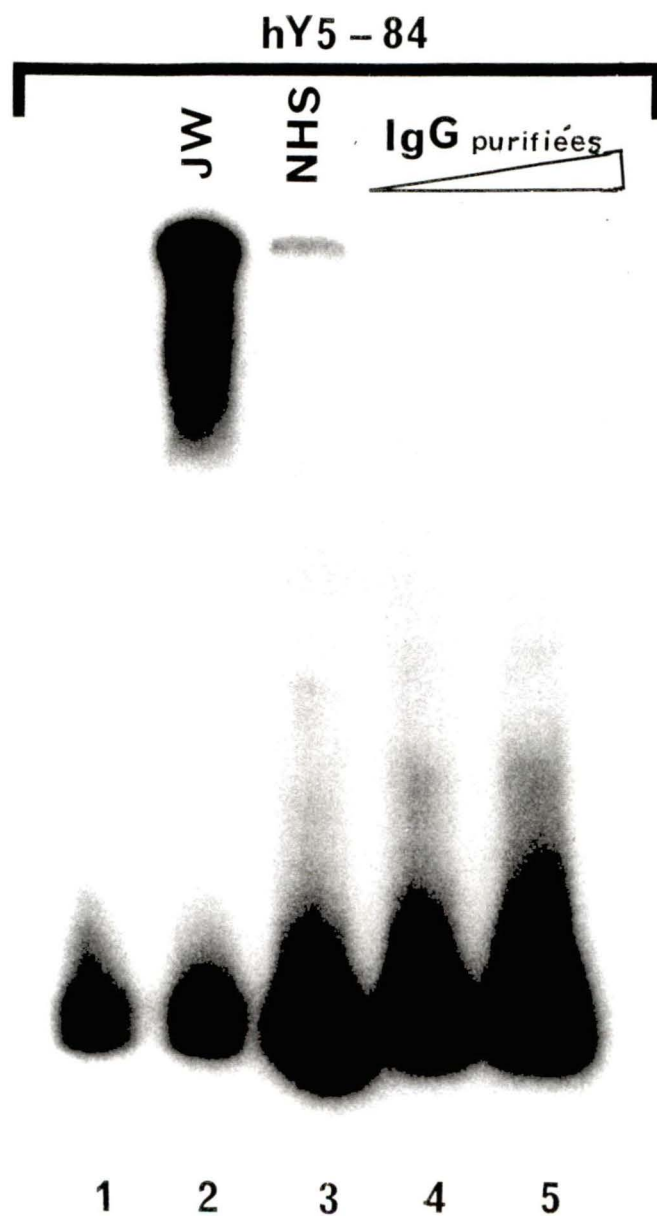
3.11.4 Essai d'affinité en suspension

Suite à tous ces contrôles, nous avons choisi d'utiliser un ARN hY5, rapport de biotine 1/10 froid car cette faible quantité de biotine permettait 1) la liaison à la streptavidine et 2) la reconnaissance par les autoanticorps. L'ARN une fois lié à la colonne est mis en présence des immunoglobulines G du sérum JW. L'utilisation des IgG au lieu du sérum total JW a pour but de réduire les possibilités de reconnaissance non-spécifique et de dégradation de l'ARN. Les étapes subséquentes, jusqu'à l'élution des autoanticorps par le tampon glycine, sont décrites dans la section 2.11 des Matériels et Méthodes. L'éluat récupéré

est concentré et testé en gel de rétention vis-à-vis de l'ARN hY5 chaud. Cet essai a été effectué par 3 fois et les résultats sont plutôt non-concluants, c'est-à-dire que chaque fois, l'ARN hY5 ne semble pas reconnu par l'éluat récupéré (Figure 21). Cette non-reconnaissance de l'ARN hY5 par l'éluat peut s'expliquer de plusieurs façons. L'hypothèse la plus probable semble être un problème de quantité. Si on compare avec les quantités d'ARN, de biotine et de billes streptavidine-agarose utilisées lors de l'isolation des autoanticorps anti-ARN U1 (Hoet et al., 1993), celles-ci sont de loin beaucoup plus élevées. En effet, l'équipe de van Venrooij a utilisé 50 µg d'ADN d'une partie de l'ARN U1, soit les régions-épitopes; la boucle II et la boucle IV (respectivement de 43 et 36 nt). La transcription comporte un rapport UTP-biotinylé/UTP de 1/20 (donc environ 2 molécules UTP-biotinylé par boucle d'ARN U1) et produit 250 µg d'ARN boucle II ou boucle IV. L'ARN U1-biotinylé est monté sur une colonne d'affinité (500 µl streptavidine-agarose) contrairement à notre essai d'affinité en suspension. De plus ils utilisent 50 mg d'IgG comme source d'anticorps de départ. Leurs résultats indiquent que 67% de l'ARN-biotinylé se lie à la streptavidine-agarose et qu'ils récupèrent 20 à 450 µg d'anticorps anti-ARN U1 spécifiques. Malgré les grandes quantités de produits utilisés pour l'isolation des anti-ARN U1 spécifiques, notre essai d'affinité en suspension telle que décrit nous semblait très réaliste. En effet, 1.4 µl de sérum JW est suffisant pour obtenir un bon signal de reconnaissance en gel de rétention (Figure 4, piste 2) et cette quantité de sérum contient environ 1.5–2 µg d'immunoglobulines totales. Or, si

**Figure 21. Vérification de la reconnaissance de l'ARN hY5-84
par les IgG anti-hY5-spécifiques purifiées**

Les IgG totales du sérum JW sont utilisées dans l'essai d'affinité en suspension dans le but de purifier les IgG hY5-spécifiques. La fraction récupérée lors de l'élution est concentrée et testée en gel de rétention. Piste 1; l'ARN seul, piste 2; sérum JW, piste 3; sérum humain normal, pistes 4 et 5; 3 et 5 μ l respectivement de la fraction (qui devraient contenir les IgG anti-hY5-spécifiques) éluées et concentrées, suite à la purification.



seulement 1% de ces IgG totales sont spécifiques à l'ARN hY5, il faudrait donc une quantité minimale (20 pg) d'anticorps anti-hY5 spécifiques pour donner un signal visible en gel de rétention. De plus, nos contrôles montraient que 90% de l'ARN-biotinylé était retenu sur les billes agarose-streptavidine. Ce sont pour ces raisons que nos quantités d'ARN, de billes et d'IgG nous semblaient suffisantes, quoique les pertes d'IgG à chaque étape peuvent être significatives. Il s'agirait donc de reprendre notre essai d'affinité en suspension et de le transformer en colonne d'affinité, en utilisant des quantités beaucoup plus importantes d'ARN-biotinylé, de billes d'agarose-streptavidine et d'IgG. Les autres hypothèses envisageables, quoique peu probables, pour expliquer la non-reconnaissance de l'ARN hY5 par l'éluat sont 1) la dénaturation des anticorps isolés par les conditions acides, 2) la perte des anticorps lors de l'étape de centrifugation dans le but de concentrer les IgG, 3) la résistance du lien ARN-anticorps aux conditions d'élution utilisées. L'éluat en question n'a donc pu être testé vis-à-vis la RNP Ro^{hY5} en gel de rétention, comme prévu.

4. DISCUSSION

Le but de ce travail consistait à mieux comprendre l'immunogénicité de l'ARN hY5, une des composantes des RNP Ro. Nous avons ainsi caractérisé davantage les autoanticorps anti-hY5. Ces anticorps représentent une nouvelle classe d'anticorps anti-ARN spécifiques. Pour ce faire, nous avons mis au point une technique pour détecter les sérums ayant la même spécificité et nous en avons déterminé la prévalence. Nous avons défini deux épitopes différents reconnus par les anticorps anti-ARN hY5. Finalement, nous avons tenté d'isoler les anti-ARN hY5 spécifiques par un essai d'affinité.

La reconnaissance spécifique de l'ARN hY5 par les anticorps a tout d'abord été observée par IPP avec le sérum du patient JW. Dans ce sérum, les anticorps anti-protéine Ro coexistent avec les anticorps anti-ARN hY5. Puis, au sein d'un grand nombre de sérums testés (56 sérums), on note une prévalence d'environ 10% des sérums anti-Ro qui immunoprécipitent aussi l'ARN hY5, la plupart faiblement (Boulanger et al., 1995). La technique de gel de rétention a été mise au point dans le but de détecter d'autres sérums anti-hY5 spécifiques et ce, dans un temps beaucoup plus rapide que nous le permettait l'IPP. De plus, la technique de gel de rétention semble plus sensible. En effet, nous avons analysé 63 sérums provenant de différents patients. Les résultats obtenus indiquent que les sérums anti-ARN hY5 sont retrouvés à une prévalence d'environ 23% parmi les sérums anti-Ro. Malgré la plus grande sensibilité du gel de rétention, la

reconnaissance des nouveaux sérums identifiés anti-hY5 positifs, demeure spécifique à deux niveaux 1) elle se retrouve seulement parmi les sérums qui produisent les anti-Ro^{hY1-5} (Tableau 1) et 2) l'ARN hY5 antisens (résultats non-montrés) ainsi que l'ARN hY1 ne sont pas reconnus en gel de rétention (Figure 5). Pour confirmer la spécificité anti-ARN hY5 de ces sérums, il serait nécessaire d'effectuer d'autres essais de gel de rétention avec les ARN hY3 et hY4. Finalement, il serait intéressant de poursuivre la recherche de sérums contenant des anti-ARN hY5 puisqu'elle permettrait une meilleure évaluation de la prévalence de ces autoanticorps.

Les sérums anti-ARN hY5 positifs en gel de rétention ont tous été testés en IPP dans le but de confirmer la plus grande sensibilité du gel de rétention. Les résultats démontrent que parmi les 10 sérums positifs en gel de rétention, seulement 2 sérums demeurent positifs en IPP sur billes de protéine A. Cette non-corrélation peut s'expliquer par le fait que certains autoanticorps anti-hY5 seraient de type IgG₃. Les IgG₃, contrairement aux IgG₁, IgG₂ et IgG₄, ne présentent pas d'affinité pour les billes de protéines A. En effet, une IPP sur billes de protéines G permet à certains sérums (2 sérums) d'immunoprécipiter l'ARN hY5. Cette observation n'implique pas tous les sérums hY5 positifs en gel de rétention, et hY5 négatifs en IPP-protéine A, mais semble valable pour les sérums MCD (Figure 13, piste 2 versus Figure 14 piste 6), et MN (résultat non-montré). Une réponse définitive à cette question serait obtenue en isolant les

IgG du sérum MCD à l'aide de la protéine G suivi d'une isolation sur protéine A. Les fractions isolées ainsi que le surnageant de chaque étape de purification seraient testés en gel de rétention. Il est possible que certains sérums anti-ARN hY5 positifs produiraient uniquement des anticorps de type IgG₃. En effet, il a été rapporté que certaines maladies autoimmunes peuvent être associées à une seule sous-classe d'immunoglobulines comme c'est le cas pour le «Pemphigus Foliaceus»³ où l'effet pathologique est causé par les IgG₄ (Rock et al., 1989). L'autre hypothèse formulée pour expliquer le fait que certains sérums reconnaissent l'ARN hY5 seulement en gel de rétention et non en IPP est que ces anti-hY5 pourraient être de type IgM ou IgA, n'ayant pas d'affinité pour les billes de protéine A ou de protéine G.

C'est tout d'abord l'absence de corrélation entre les résultats obtenus par les deux techniques qui nous a suggéré qu'il pourrait exister des populations différentes d'autoanticorps anti-ARN hY5. À l'aide des résultats obtenus concernant la détermination de l'épitope, nous avons pu prouver cette hypothèse. Les sérums JW et MCD, tous deux anti-ARN hY5 positifs en gel de rétention et en IPP-protéine G, ne ciblent pas le même épitope sur l'ARN hY5. En effet, le sérum JW reconnaît tous les ARN hY5, peu importe la mutation (mutants hY5-80, hY5-84«O» et hY5-78), à condition que ces ARN conservent leur extrémité 3' intacte. Par contre le sérum JW ne reconnaît aucun des mutants

³ Le «Pemphigus Foliaceus» est une maladie autoimmune éruptive endémique à certaines régions du Brésil.

hY5 dont l'extrémité 3' est tronquée au site Alu I (Figure 15). L'épitope de JW peut se définir plus précisément si on combine les résultats obtenus 1) de la digestion partielle à la RNase T1, 2) de la cartographie de l'épitope et 3) de l'étude d'homologie des autres ARN hY non-reconnus. La digestion à la RNase T1 génère deux fragments, l'un de 27 nt, représentant l'extrémité 5' de l'ARN hY5 et l'autre de 31 nt qui représente l'extrémité 3' amputée des 7 derniers nucléotides en 3' (position 77–84) (Figure 2). Ces deux fragments sont toujours reconnus par les autoanticorps, si et seulement s'ils sont appariés. Les études de cartographie de l'épitope à l'aide des mutants hY5 démontrent que les nucléotides ciblés par le sérum JW se situent entre les nucléotides 73 et 84; les 4 derniers (position 80–84) étant impliqués dans la liaison de la protéine La et présents chez les autres ARN hY. L'épitope reconnu par les anti-hY5 du sérum JW, nommé épitope A, est donc conformationnel et impliquerait au moins les nucléotides 5'–CUUG–3', position 74 à 77. La production d'un ARN hY5 mutant dans cette région et son essai en gel de rétention pourrait confirmer la localisation proposée de l'épitope ciblé par le sérum JW. Le sérum MCD quand à lui n'a pas besoin de l'extrémité 3' (site Alu I) pour reconnaître l'ARN hY5. En effet, le sérum MCD reconnaît le mutant hY5–78 mais non les mutants hY5–84«O» et hY5–80 (Figure 15). De plus l'ARN hY5 tronqué en 3' au site Hha I n'est plus reconnu. L'ensemble de ces résultats suggère que l'épitope ciblé par ce sérum requiert au moins les 4 nucléotides de la boucle 5'–AACC–3' (position 58–61), appelé épitope B. La conformation générée par la boucle est essentielle

à la reconnaissance de l'ARN hY5 par le sérum MCD. En effet, le mutant hY5-84«O» contient les nucléotides 58-61 mais ceux-ci ne présentent pas la structure hélice-boucle-hélice, étant donné le non-appariement des deux brins et la déstabilisation de la double hélice centrale. On pourrait expliquer la non-reconnaissance de l'ARN hY5/Hha I de façon similaire. L'absence de l'extrémité 3' (position 64-84 nt) pourrait permettre un nouvel appariement qui impliquerait la boucle de 4 nucléotides 5'-AACC-3' avec les nucléotides suivants 5'-UUGU-3', position 16 à 19 (Figure 18). Les sérums anti-ARN hY5 positifs présentés dans le Tableau 1 semblent se distribuer de la façon suivante; 2 sérums (JW et MD) sont dirigés contre l'épitope A comparativement à 4 sérums (MCD, GD, RD, et JB) contre l'épitope B. Les anticorps dirigés contre chacun des deux épitopes semblent mutuellement exclusifs. D'autres tests seraient nécessaires pour déterminer l'épitope reconnu par les sérums MN, JDB, PR et SM (Tableau 1). La possibilité que certains sérums puissent cibler d'autres épitopes sur l'ARN hY5 que ceux déjà décrits, n'est pas exclue. De plus, nous rapportons que se sont les sérums dont les anti-hY5 sont dirigés contre l'épitope A qui immunoprécipitent fortement l'ARN hY5, tandis que ceux dirigés contre l'épitope B immunoprécipitent faiblement ou pas du tout l'ARN hY5 lorsque les billes de protéine A sont utilisées (résultats non-montrés). De plus, les régions antigéniques de l'ARN hY5 ici rapportées sont distinctes des régions de liaison des protéines Ro et La connues. L'exclusion du site d'attachement des protéines Ro60 et La est en accord avec le fait que les autres ARN Ro qui contiennent eux

aussi cette région ne sont pas reconnus par ces autoanticorps. Cela pourrait signifier que les anti-ARN hY5 ne sont pas des anticorps anti-idiotypiques. Si cela avait été le cas, les anti-ARN hY5 auraient été produits initialement contre la région où la protéine Ro60 se lie, sur l'ARN hY5. Ainsi comme l'idiotype des anticorps imiterait l'empreinte de la protéine Ro60, ça serait par mimétisme moléculaire que les anticorps anti-idiotypes reconnaîtraient l'ARN hY5 et ils seraient donc dirigés contre la région de l'ARN liant la protéine Ro60. Nos résultats vont donc à l'encontre de cette hypothèse.

Afin de vérifier si les anticorps du sérum JW reconnaissent l'ADN correspondant à l'ARN hY5, nous avons testé un oligonucléotide d'ADN de 20 nucléotides correspondant aux nucléotides 64–84 de l'ARN hY5. Nos résultats illustrent que l'oligo d'ADN n'est pas reconnu (Figure 19, piste 6). Ces résultats ne répondent pas réellement à notre question, car la non-reconnaissance de l'oligo n'implique pas nécessairement la non-reconnaissance de l'ADN hY5. Comme on sait que l'épitope en question (épitope A) est conformationnel, il faudrait donc utiliser un oligo d'ADN de pleine longueur (84 nt) simple brin, pour s'assurer que les anticorps anti-ARN hY5 sont spécifiques ou non à l'ARN. La conformation adoptée par l'oligo d'ADN hY5 devrait théoriquement être presque la même que celle de l'ARN hY5, comme le fait l'ADNt sb correspondant à l'ARNt de la méthionine de levure (Paquette et al., 1990).

Nous nous sommes intéressés à savoir si les anti-ARN hY5 spécifiques reconnaîtraient toujours l'ARN lorsque celui-ci est lié aux protéines Ro60 et La, ou si la conformation des épitopes serait alors détruite ou cachée. Pour effectuer de tels essais, nous devons absolument purifier les anticorps anti-ARN hY5, car le sérum complet contient aussi des anticorps anti-protéines Ro. Pour ce faire, nous avons mis au point un essai d'affinité en suspension basé sur la forte interaction qui existe entre la biotine et la streptavidine. Les contrôles nécessaires ont été établis, soit 1) que l'ARN-biotinylé est toujours reconnu par les anticorps, 2) que l'ARN biotinylé se lie bien aux billes streptavidine-agarose et 3) que le lien biotine-streptavidine est conservé même lors de l'étape d'élution (pH 2.3) des IgG (Tableau 2, Figure 20). Nous n'avons cependant pas réussi à isoler des quantités suffisantes d'anticorps spécifiques. L'alternative serait de réaliser une colonne d'affinité basée sur le même principe mais en utilisant cette fois-ci des quantités beaucoup plus grandes d'ARN hY5-biotinylé, de billes streptavidine-agarose et d'immunoglobulines G totales de différents sérums. Nous prévoyons que la réponse à cette question serait affirmative. Cette hypothèse se base sur l'homologie qui existe entre le système Ro et le système U1. En effet, la reconnaissance des anti-ARN U1 spécifiques est conservée face aux RNP U1 (Hoet et al., 1995).

Compte tenu que la majorité des sérums anti-ARN hY5 identifiés ont été prélevés chez des patients atteints de LED sévère, il serait très intéressant de

faire un lien avec le côté clinique de la maladie. Il s'agirait de vérifier s'il existe une corrélation entre la présence des anti-ARN hY5 et l'évolution de la maladie. Si cela se confirme, la détection des autoanticorps anti-ARN hY5 pourrait être utilisée comme test diagnostique pour suivre l'évolution de la maladie du LED. Une corrélation pareille a été décrite pour les patients atteints de MCTD qui produisent des anticorps anti-ARN U1 (Hoet et al., 1991) ainsi que pour les patients atteints de LED produisant des anti-ADN double brin (Lloyd et Schur, 1981). De façon plus générale, toute identification de sérums contenant des anticorps anti-ARN spécifiques pourrait se faire avantageusement à l'aide de la technique du gel de rétention qui est simple à utiliser. Par cette technique, plusieurs sérums peuvent être analysés simultanément et plus rapidement que par IPP. De plus, il est facile de faire des études quantitatives par gel de rétention.

Durant cette présente étude, nous avons évalué la structure secondaire des ARN hY5 mutants à l'aide des prédictions du programme MULFOLD (Zuker et Jeager, 1989). Ce programme informatisé propose les structures secondaires les plus stables, contrairement au programme FOLD (Zuker et Stiegler, 1981) qui propose la structure secondaire qui est la plus probable sans tenir compte de la possibilité qu'un ARN puisse adopter simultanément d'autres structures secondaires. Les structures secondaires prédites sont celles qui libèrent un maximum d'énergie libre. MULFOLD représente donc un outil fort utile à l'étude

de l'ARN bien qu'il comporte aussi certaines limitations. Mentionnons entre autres qu'une analyse basée uniquement sur l'énergie libre fait abstraction de l'arrangement tridimensionnel de l'ARN. L'interprétation de certaines données dépend donc de la fiabilité du modèle utilisé. La structure secondaire la plus stable prédite pour l'ARN hY5 (hY5, Figure 12) par le programme MULFOLD correspond à celle obtenue par des expériences de protection aux RNases effectuées antérieurement (Wolin et Steitz, 1984). Cependant une nouvelle structure secondaire pour l'ARN hY5 a été déterminée, en utilisant des techniques de modifications chimiques et «enzymatic structure probing» (van Gelder et al., 1994). Celle-ci est légèrement différente de celle préalablement décrite et correspond en fait à la deuxième structure (hY5/2, Figure 12) la plus stable pour le programme MULFOLD. En réalité, il est probable que les deux structures coexistent mais que celle de hY5 soit adoptée préférentiellement *in vitro* tandis que la structure hY5/2 soit favorisée *in vivo*.

L'ensemble des observations que nous avons réalisées nous amène enfin à conclure qu'il existe au moins deux populations d'anticorps anti-ARN hY5 ciblant chacune des épitopes différents. Ces épitopes sont tous deux conformationnels et sont délimités à deux régions adjacentes aux deux extrémités du site de liaison de la protéine Ro60. Les anticorps dirigés contre chacun des deux épitopes semblent mutuellement exclusifs. Compte tenu qu'aucune molécule liant l'ARN hY5 à ces sites n'a été identifiée jusqu'à

maintenant, on peut considérer que les régions antigéniques sont disponibles pour interagir avec d'autres molécules ou pour être liées par les autoanticorps. De plus, les épitopes définis dans cette présente étude pourraient constituer les parties fonctionnelles de l'ARN hY5 et/ou de la RNP Ro^{hY5}. Cette hypothèse est basée sur les résultats de plusieurs autres études sur les anti-ARN où le déterminant antigénique est souvent responsable d'un rôle cellulaire bien défini (e.g.: l'épitope ciblé par les anti-ARNr 28S se trouve être le centre GTPase de la sous-unité ribosomale 50S). La localisation des épitopes supporte l'idée que les autoanticorps anti-ARN hY5 seraient le résultat d'un processus d'immunisation dirigé par l'autoantigène lui-même, soit par la RNP Ro^{hY5}. Ce mécanisme avait déjà été suggéré pour la production des anticorps anti-Ro lorsque des sérums reconnaissant spécifiquement la RNP Ro^{hY5} ont été identifiés (Boire et Craft, 1990). De plus, l'immunisation directe par l'antigène serait aussi le mécanisme de production de la majorité des anticorps anti-ARN (Hoet et al., 1992). La caractérisation des anticorps anti-ARN hY5 des sérums positifs autres que ceux caractérisés ici pourrait apporter d'autres indices concernant les mécanismes autoimmuns impliqués et pourrait venir appuyer nos observations. Le fait que nous ayons identifiés seulement des anti-ARN hY5, et aucun anti-ARN hY1, 3 et 4, reste un point à élucider, suggérant un rôle immunogénique pour la RNP Ro^{hY5}.

Ces résultats s'inscrivent dans le cadre des efforts qui sont déployés pour caractériser la structure et les fonctions de la RNP Ro, à mieux comprendre les RNP Ro en tant qu'autoantigène, à aider au développement de meilleurs outils diagnostiques et thérapeutiques concernant les maladies autoimmunes, et à mieux comprendre les dysfonctions du système immunitaire qui conduisent à l'autoimmunité. De plus, les ARN hY5 mutants pourront servir à l'étude des interactions se produisant au sein des RNP Ro et à la recherche d'autres protéines associées à la RNP Ro, jusqu'à maintenant inconnues.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Gilles Boire de m'avoir fait confiance en m'accueillant dans son équipe. Il a su bien diriger mes travaux durant ces 2 années. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à mon co-directeur, le Dr Benoît Chabot, pour ses conseils et ses commentaires pertinents.

Merci aussi à toute l'équipe de l'Unité des maladies Rhumatismales pour son soutien constant. Merci spécialement à Maryse Gendron et Guylaine Talbot pour leurs connaissances partagées, leur encouragement et leur amitié.

J'aimerais remercier le «Fonds pour la formation de Chercheurs et pour l'Aide à la Recherche» (FCAR) qui m'a supportée financièrement pour la réalisation de cette recherche.

RÉFÉRENCES

- Alger et al., Immunologie à l'usage des étudiants en médecine, en pharmacie et en biologie Tome II. Éditions Crouan & Roques, Lille. (1980).
- Alspaugh, M.A., N. Tatal et E.M. Tan (1976). Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216–222.
- Alspaugh, M.A. et E.M. Tan (1975). Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067–1073.
- Alspaugh, M. et P. Maddison (1979). Resolution of the identity of certain antigen–antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum.* 22:796–798.
- Association des Enseignements d'Immunologie des universités de langue française. Immunologie générale, 2^e édition. MEDS/McGRAW–HILL, Paris. (1991).
- Ausubel, F.M. et al. Short protocols in molecular biology (1992). Second Edition. New–York.
- Bach, J.–F., Immunologie. Flammarion Médecine Sciences. (1984).
- Balcon, R. Autoantibodies as probes in cell and molecular biology (1993). *Autoantibodies in Cell Biol.* 204:138–154.

- Baum, H., P. Butler, H. Davies, M.J.E. Sternberg et A.K. Burroughs (1993). Autoimmune disease and molecular mimicry: an hypothesis. *TIBS*. 18:140–145.
- Ben-Chetrit, E., B.J. Gandy, E.M. Tan et K.F. Sullivan (1989). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J. Clin. Invest.* 83:1284–1292.
- Ben-Chetrit, E., E.K.L. Chan, K.F. Sullivan et E.M. Tan (1988). A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.* 167:1560–1571.
- Boire, G. et J. Craft (1989). Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. Analysis with sera specific for the Ro^{hY5} particle. *J. Clin. Invest.* 84:270–279.
- Boire, G. et J. Craft (1990). Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J. Clin. Invest.* 85:1182–1190.
- Boire, G., F.J. Lopez-Longo, S. Lapointe et H.A. Ménard (1991). Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kD Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum.* 34:722–730.
- Boire, G., H.A. Ménard, M. Gendron, A. Lussier et D. Myhal (1993). Rheumatoid Arthritis: Anti-Ro antibodies define a non-HLA associated clinicoserological cluster. *J. Rheumatol.* 20:10.

- Boire, G., M. Gendron, N. Monast, B. Bastin et H.A. Ménard (1995). Purification of antigenically intact Ro ribonucleoproteins; biochemical and immunological evidence that the 52-kD protein is not a Ro protein. *Clin. Exp. Immunol.* 100(3):489.
- Boulanger, C., B. Chabot, H.A. Ménard et G. Boire (1995). Autoantibodies in human anti-Ro sera specifically recognize deproteined hY5 Ro RNA. *Clin. Exp. Immunol.* 99:29-36.
- Bunn, C.C. et M.B. Mathews (1987). Autoreactive epitope defined as the anticodon region of alanine transfer RNA. *Science* 238:1116-1119.
- Bunn, C.C., R.M. Bernstein et M.B. Mathews (1986). Autoantibodies against alanyl-tRNA synthetase and tRNA^{Ala} coexist and are associated with myositis. *J. Exp. Med.* 163:1281-1291.
- Buyon, J.P. et R. Winchester (1990). Congenital complete heart block. A human model of passively acquired autoimmune injury. *Arthritis Rheum.* 33:609-614.
- Carson, D.A., et J.M. Ribeiro. Apoptosis and disease. *The Lancet.* 341:1251-1254.
- Chabot, B. Synthesis and purification of RNA substrates. In: S.J Higgins, B.D. Hames, eds. RNA processing: a practical approach Vol. I (1994). Oxford: IBL Press, Oxford. 1-29.
- Chambers, J.C., D. Kenan, B.J. Martin et J.D. Keene (1988). Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J. Biol. Chem.* 263:18043-18051.

- Chan, E.K.L., E.M. Tan (1987a). The small nuclear ribonucleoprotein SS-B/La binds RNA with a conserved protease-resistant domain of 28 kilodaltons. *Mol. Cell. Biol.* 7:2588–2591.
- Chan, E.K.L., E.M. (1987b). Human autoantibody-reactive epitopes of SS-B/La are highly conserved in comparison with epitopes recognized by murine monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 166:1627–1640.
- Chan, E.K.L. et L.E.C. Andrade (1992). Antinuclear antibodies in Sjögren's syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 18:551–570.
- Chan, E.K.L., J.C. Hamel, J.P. Buyon et E.M. Tan (1991). Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J. Clin. Invest.* 87:68–76.
- Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J.P. Shapiro, M.J. Brauer, M.C. Kiefer, J.P. Barr et J.D. Mountz (1994). Identification of a soluble form of the fas molecule that protects cells from fas-mediated apoptosis. *Science.* 263:1759–1761.
- Chu, J.L., N. Brot, H. Weissbach et K. Elkon (1991). Lupus antiribosomal P antisera contain antibodies to a small fragment of 28S rRNA located in the proposed ribosomal GTPase center. *J. Exp. Med.* 174:507–514.
- Clark, G., M. Reichlin et T.B. Tomasi Jr. (1969). Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 102:117–122.
- Deutscher, S.L. et J.D. Keene (1988). A sequence-specific conformational epitope on U1 RNA is recognized by a unique autoantibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3299–3303.

- Deutscher, S.L., J.B. Harley et J.D. Keene (1988). Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9479–9483.
- Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker et J.S. Mattick (1991). «Touchdown» PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.
- Dziarski, R. (1988). Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction. *Immunol. Today* 9:340–342.
- Elkon, K.B. Autoantibodies in SLE. In: J.H. Klippel et P.A. Dieppe. Rheumatology (1994). Mosby, London. 6.4.1–6.4.10.
- Fisher, U., et R. Lührmann (1990). An essential signaling role for m3G in the transport of U1 snRNP to the nucleus. *Science*. 249:786.
- Freiser, S.M., R. Kierzek, J.A. Jaeger, N. Sugimoto, M.H. Caruthers, T. Neilsons et D.H. Turner (1986). Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9373–9377.
- Fridman, W.H., Le cerveau mobile; de l'immunité au système immunitaire. Hermann Éditeurs des sciences et des arts. Paris (1991). 216 p.

- Furukawa, F., M. Kashihara-Sawami, M.B. Lyons et D.A. Norris (1990). Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J. Invest. Dermatol.* 94:77-85.
- Furukawa, F., M.B. Lyons, L.A. Lee, S.N. Coulter et D.A. Norris (1988). Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. *J. Immunol.* 141:1480-1488.
- Gualde, N., Révision accélérée en immunologie. Éditions Maloine, Paris. (1989).
- Gottlieb, E. et J.A. Steitz (1989). Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* 8:851-861.
- Hardin, J.A. (1986). The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 29:457-460.
- Harley J.B., R.H. Scofield et M. Reichlin (1992). Anti-Ro in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18:337-358.
- Harlow, E. et D. Lane (1988). Antibodies : A laboratory manuel. Cold Spring Harbor Laboratory
- Harmon, C.E., J.S. Deng, C.L. Peebles et E. M. Tan. (1984). The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthristis Rheum.* 27:166-173.

- Hendrick, J.P., S.L. Wolin, J. Rinke, M.R. Lerner et J.A. Steitz (1981). Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1:1138–1149.
- Ho, S.N., H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen et L.R. Pease (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51–59.
- Hoet, R.M. et W.J. van Venrooij (1992). B-cell epitopes of RNA autoantigens. *Mol. Biol. Reports* 16:199–205.
- Hoet, R.M., I. Koornneef, D.J. de Rooij, L.B. van de Putte et W.J. van Venrooij (1992a). Changes in anti-U1 RNA antibody levels correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus overlap syndrome. *Arthritis Rheum.* 35:1202–1210.
- Hoet, R.M., P. De Weerd, J. Klein Gunnewiek, I. Koornneef et W.J. van Venrooij (1992b). Epitope regions on U1 small nuclear RNA recognized by anti-U1 RNA-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 90:1753–1752.
- Hoet, R.N., B. Kastner, R. Luhrmann et W.J. van Venrooij (1993). Purification and characterization of human autoantibodies directed to specific regions on U1RNA; recognition of native U1RNP complexes. *Nucleic Acids Res.* 21(22):5130–5136.
- Itoh, K., Y. Itoh et m.B. Frank (1991). Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J. Clin. invest.* 87:177–186.

- Itoh, Y, M.D. Rader et M. Reichlin (1990). Heterogeneity of the Ro/SSA antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence for the four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.* 81:45-51.
- Itoh, Y. et M. Reichlin (1991). Ro/SS-A antigen in human platelets. Different distributions of the isoforms of Ro/SS-A protein and the Ro/SS-A-binding RNA. *Arthritis Rheum.* 34:888-893.
- Kato, N., H. Hoshino et F. Harada (1982). Nucleotide sequence of 4.5S RNA (C8 or hY5) from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108:363-370.
- Kelekar, A., M.R. Saitta et J.D. Keene (1994). Molecular composition of Ro small ribonucleoprotein complexes in human cells. *J. Clin. Invest.* 93:1637-1644.
- Kenan, D.J., C.C. Query et J.D. Keene (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16:214-220.
- Lee, L.A., C.E. Harmon, J.C. Huff, D.A. Norris et W.L. Weston (1985). The demonstration of SS-A/Ro antigen in human fetal tissues and in neonatal and adult skin. *J. Invest. Dermatol.* 85:143-146.
- Lee, L.A., K.K. Gaither, S.N. Coulter, D.A. Norris et J.B. Harley (1989). Pattern of cutaneous immunoglobulin G deposition in subacute cutaneous lupus erythematosus is reproduced by infusing purified anti-Ro (SSA) autoantibodies into human skin-grafted mice. *J. Clin. Invest.* 83:1556-1562.

- Lee, L.A., W.L. Weston, G.G. Krueger, M. Emam, M. Reichlin, J.O. Stevens, S.K. Surbrugg, A. Vasil et D.A. Norris (1986). An animal model of antibody binding in cutaneous lupus. *Arthritis Rheum.* 29:782-788.
- LeFeber, W.P., D.A. Norris, S.R. Ryan, J.C. Huff, L.A. Lee, M. Kubo, S.T. Boyce, B.L. Kotzin et W.L. Weston (1984). Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 74:1545-1551.
- Lerner, M.R., J.A. Boyle, J.A. Hardin et J.A. Steitz (1981). Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 211:400-402.
- Lieu, T.-S., M.M. Newkirk, J.D. Capra et R.D. Sontheimer (1998). Molecular characterization of human Ro/SS-A antigen. Aminoterminal sequence of the protein moiety of human Ro/SS-A antigen and immunological activity of corresponding synthetic peptide. *J. Clin. Invest.* 82:96-101.
- Lloyd W., P.H. Schur (1981). Immune complexes, complement and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). *Medecine.* 60:298-217.
- Mamula, M.J., C.A. O'Brien, J.B. Harley et J.A. Hardin (1989). The Ro ribonucleoprotein particle: induction of autoantibodies and the detection of Ro RNAs among species. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52:435-446.
- Mamula, M.J., E.D. Silverman, R.M. Laxer, L. Bentur, B. Isacovics et J.A. Hardin (1989). Human monoclonal anti-La antibodies. The La protein resides on a subset of Ro particles. *J. Immunol.* 143:2923-2928.

- Mattioli, M. et M. Reichlin (1974). Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* 17:421-429.
- Miller, F.W., K.A. Waite, T. Biswas et P.H. Plotz (1990). The role of an autoantigen, histidyl-tRNA synthetase, in the induction and maintenance of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:9933-9937.
- Mountz, J.D., J. Wu, J. Cheng et T. Zhou (1994) Autoimmune disease : A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum.* 10:1415-1420.
- O'Brien, C.A. et J.B. Harley (1990). A subset of hY RNAs is associated with erythrocyte Ro ribonucleoproteins. *EMBO J.* 9:3683-3689.
- O'Brien, C.A. et S.L. Wolin (1994). A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Gene & Dev.* 8:2891-2903.
- Okano, Y. et T.A. Medsger Jr. (1992). Novel human autoantibodies reactive with 5'-terminal trimethylguanosine cap structures of U small nuclear RNA. *J. Immunol.* 149:1093-1098.
- Paquette J., K. Nicoghossian, G.R. Qi, N. Beauchemin et R. Cedergren (1990). The conformation of single-stranded nucleic acids tDNA versus tRNA. *Eur. Jour. Bioch.* 189(2):259-265.
- Peek, R., G.J.M. Pruijn, A.J.W. van Venrooij (1993). Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents (1993). *J. Cell. Science.* 106:929-935.

- Pizer, L.I., J.S. Deng, R.M. Stenberg, et E.M. Tan (1983). Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in adenovirus-infected and uninfected KB cells. *Mol. Cell. Biol.* 3:1235-1245.
- Plotz, P.H. (1992). The role of autoantigens in the induction and maintenance of autoimmunity. *Mol. Biol. Reports* 16:127-132.
- Pruijn, G.J.M., R.L. Slobbe et W.J. van Venrooij (1991). Analysis of protein-RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* 19:5173-5180.
- Pruijn, G.J.M., P.A.E.T.M. Wingers, S.L.M. Peters, J.P.H. Thijssen et W.J. van Venrooij (1993) Ro RNP associated Y RNAs are highly conserved among mammals. *Bioch. Biophys. Acta.* 1216:395-401.
- Rader, M.D., C. O'Brien, Y. Liu, J.B. Harley et M. Reichlin (1989). Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J. Clin. Invest.* 83:1293-1298.
- Reichlin, M. (1986). Significance of the Ro antigen system. *J. Clin. Immunol.* 6:339-348.
- Rock, B., R.C. Martins, A.N. Theofilopoulos, R.S. Balderas, J.A. Grant, et al. (1989). *The New Engl. J. Med.* 320(22):1463-1469.
- Roitt, I. Immunologie. Éditions Pradel, Paris (1990). p.238-253.

- Rokeach, L.A., J.A. Haselby, J.F. Meilof, R.J.T. Smeenk, T.R. Unnasch, B.M. Greene et S.O. Hoch (1991) Characterization of the autoantigen calreticulin. *J. Immunol.* 147(2):3031–3039.
- Saitta, M.R. et J.D. Keene (1992). Molecular biology of nuclear autoantigens. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18:283–310.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. Second Edition. C. Nolan, Editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. (1989).
- Sanger, F., S. Nicklen et A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74–5463–5467.
- Schwartz R.S., B.D. Stollar (1985). Origins of anti-DNA auto-antibodies. *J. Clin. Invest.* 75:321–327.
- Slobbe, R.L., G.J.M. Pruijn et W.J. van Venrooij (1991). Ro (SS-A) and La (SS-B) ribonucleoprotein complexes: structure, function and antigenicity. *Ann. Med. Interne* 142:592–600.
- Slobbe, R.L., W. Pluk, W.J. van Venrooij et G.J.M. Pruijn (1992). Ro ribonucleoprotein assembly *in vitro*. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 227:361–366.
- Stefano, J.E. (1984). Purified lupus antigen La recognizes an oligouridyate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 36:145–154.

- Targoff, I.N. Autoantibodies to aminoacyl-transfer RNA synthetases for isoleucine and glycine; Two additional synthetases are antigenic in myositis (1990). *J. Immunol.* 144(5):1737-1743.
- Tan, E.M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44:93-151.
- Tan, E.M. (1991). Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67:841-842.
- Uchiumi, T., R.R. Traut, K. Elkon et R. Kominami (1991). A human autoantibody specific for a unique conserved region of 28S ribosomal RNA inhibits the interaction of elongation factors 1a and 2 with ribosomes. *J. Biol. Chem.* 266:2054-2062.
- van Gelder, C.W.G., J.P.H.M. Thijssen, E.C.J. Klaassen, C. Sturchler, A. krol, W.J. van Venrooij et G.J.M. Pruijn (1994). Common structural features of the RNP associated hY1 et hY5 RNAs. *Nucleic Acids Research*, 22(13)2498-2506.
- van Venrooij, W.J., R. Hoet, J. Castrop, B. Hageman, I.W. Mattaj et L.B. van de Putte (1990). Anti-(U1) small nuclear RNA antibodies in anti-small nuclear ribonucleoprotein sera from patients with connective tissue diseases. *J. Clin. Invest.* 86:2154-2160.
- Vuitton, D.A., et al., Immunologie. MEDS/McGRAW-HILL, Paris. (1990). 348 p.
- Weir, D.M., Immunology, sixth edition. Churchill Livingstone, New-York. (1988). 312 p.

- Whittingham, S. (1992). B-cell epitopes of La and Ro autoantigens. *Mol. Biol. Reports* 16:175–181.
- Wilusz, J. et J.D. Keene (1986). Autoantibodies specific for U1 RNA and initiator methionine tRNA. *J. Biol. Chem.* 261: 5467–5472.
- Wolin, S.L. et J.A. Steitz (1983). Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell* 32:735–744.
- Wolin, S.L. et J.A. Steitz (1984). The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1996–2000.
- Yanish-Perron, C., J. Vierra et J. Messing (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119.
- Zuker, M. et P. Stiegler (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* 9:133–148.
- Zuker, M., J.A. Jaeger et D.H. Turner (1989) Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:7706–7710.

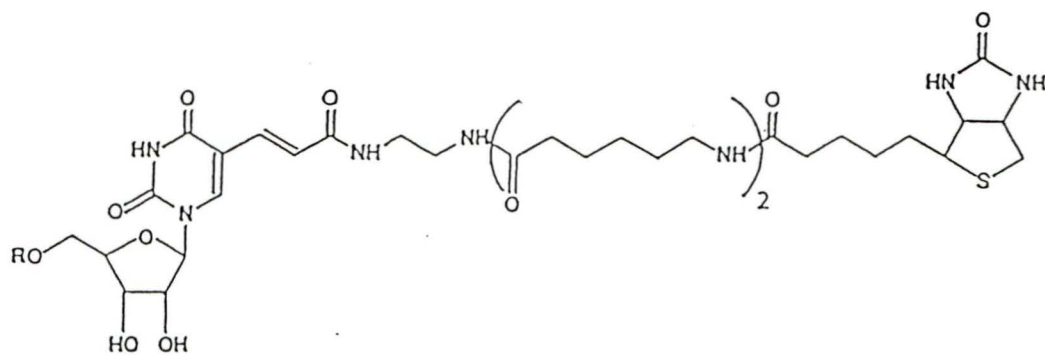
ANNEXE I

PROGRAMME PCR TOUCHDOWN

(Don et al.,1991. Nucleic Acids Research 10:4008)

1. 94°C, 1.5 min. → 71°C, 2 min. → 72°C, 3min.
2. 94°C, 1.5 min. → 69°C, 2 min. → 72°C, 3min.
3. 94°C, 1.5 min. → 67°C, 2 min. → 72°C, 3min.
4. 94°C, 1.5 min. → 65°C, 2 min. → 72°C, 3min.
5. 94°C, 1.5 min. → 63°C, 2 min. → 72°C, 3min.
6. 94°C, 1.5 min. → 61°C, 2 min. → 72°C, 3min.
7. 94°C, 1.5 min. → 59°C, 2 min. → 72°C, 3min.
8. 94°C, 1.5 min. → 57°C, 2 min. → 72°C, 3min.
9. 94°C, 1.5 min. → 55°C, 2 min. → 72°C, 3min.
10. 94°C, 1.5 min. → 53°C, 2 min. → 72°C, 3min.
11. 94°C, 1.5 min. → 51°C, 2 min. → 72°C, 3min.
12. 94°C, 1.5 min. → 50°C, 2 min. → 72°C, 3min.
13. Retour à l'étape 12 et répéter 15X (ou plus)
14. 72°C, 14 min.
15. 4°C, 12 heures

ANNEXE II



Biotine-21-UTP